

**ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Xenorhabdus bovienii* -  
Poinar, SIMBIONTE DEL NEMATODO ENTOMOPARÁSITO *Steinernema  
feltiae* SOBRE *Fusarium spp* EN EL CULTIVO DE TOMATE – *Solanum  
lycopersicum L.***

**MARÍA CLAUDIA LEGUÍZAMO BERMÚDEZ**

**Universidad Nacional De Colombia  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Doctorado en Ciencias Agropecuarias  
Área de Énfasis Suelos  
Palmira  
2012**

**ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Xenorhabdus bovienii* -  
Poinar, SIMBIONTE DEL NEMATODO ENTOMOPARÁSITO *Steinernema  
feltiae* SOBRE *Fusarium spp* AISLADO DE TOMATE – *Solanum  
lycopersicum L.***

**MARÍA CLAUDIA LEGUÍZAMO BERMÚDEZ**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de  
DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS, ÁREA DE ENFASIS SUELOS.**

**Directora  
Marina Sánchez de Prager. Ph. D.**

**Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Doctorado en Ciencias Agropecuarias  
Área de Énfasis Suelos  
Palmira  
2012**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE PALMIRA

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**ACTA DE JURADO DE TESIS**

**DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS  
LINEA DE INVESTIGACIÓN MANEJO DE SUELOS Y AGUAS**

En Palmira al 19 del mes de Enero de 2012, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los doctores ANA TERESA MOSQUERA ESPINOSA, EYDER DANIEL GOMEZ LOPEZ y JUAN CARLOS MENJIVAR FLORES

Para calificar la Tesis de Grado de:

**MARIA CLAUDIA LEGUIZAMO BERMUDEZ**

Titulada:

"Actividad de Metabolitos secundarios de *Xenorhabdus bovienii* Poinar, sobre seis (6) aislados de *Fusarium oxysporum* Hongos Fitopatogenos habitantes del suelo y la rizosfera de cultivos de tomate = *Solanum lycopersicum* L. en el Valle del Cauca" bajo la dirección de Marina Sánchez de Prager, Ph.D.

Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los investigadores ANA TERESA MOSQUERA ESPINOSA, EYDER DANIEL GOMEZ LOPEZ y JUAN CARLOS MENJIVAR FLORES, y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADA ☒

REPROBADA ☐

ANA TERESA MOSQUERA E.

EYDER DANIEL GOMEZ L.

JUAN CARLOS MENJIVAR F.

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

“La Facultad y los jurados de la tesis no se harán responsables de las ideas emitidas por el autor”.

Artículo 24, Resolución 04 de 1974.

## DEDICATORIA

*A mi hija  
A mis padres, a mi hermano  
y a mis Abuelos, por todo lo que aprendí y compartí con ellos....*

## AGRADECIMIENTOS

Especialmente a mi hija, a mis papás y hermano, por comprender mi falta de tiempo para compartir con ellos.

A la Profesora Marina Sánchez de Prager por su dedicación y guía en el desarrollo de la tesis y la elaboración del escrito.

A Javier Martínez, Diana Vela, Sharon Davey Clavijo, Alexandra García y Julio César Parada, por su apoyo en los trabajos de extracción de materiales en campo y en el trabajo de laboratorio.

A Francisco Sánchez, por su apoyo en la ejecución y análisis estadístico de la tesis.

A Rafael Cruz, por su apoyo y paciencia en el Laboratorio de Malherbología de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, donde se llevó a cabo el aislamiento de los metabolitos secundarios y se adelantaron los ensayos.

A Luis H. Lotero por su apoyo en el Laboratorio de Microbiología de Suelos de la facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, donde se realizó el aislamiento de los hongos patógenos y su identificación.

A Paola González y Diana Mora por su apoyo en la diagramación del documento.

A Edgar Hincapié y Gustavo Bermúdez por su colaboración en el planteamiento estadístico de los resultados.

A Yezid Díaz por su apoyo en la realización de informes en el IGAC y por su incomparable compañía en todo el proceso de escritura del documento.

A los jurados de la sustentación Ana Teresa Mosquera, Eyder Daniel Gómez y Juan Carlos Menjivar, por su presencia y sus valiosos aportes en la presentación y en el documento escrito.

Al Ingeniero Agrónomo, M.Sc (Fitopatología) Carlos A. Huertas por su revisión y colaboración en el escrito sobre el hongo *Fusarium* spp.

Al macroproyecto: “Escalado y Formulación Industrial de *Steinernema feltiae* (Cephalobina Steinernematidae) Cepa Colombiana y su bacteria Simbionte *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae) para el control de insectos y

fitopatógenos” avalado por Colciencias. Por su financiación para el desarrollo de la tesis.

A la División de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia, Palmira (DIPAL), Por su financiación para el desarrollo de la tesis.

## Contenido

	PÁG.
INTRODUCCIÓN.....	17
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE .....	22
2.1 SIMBIOSIS <i>Steinernema feltiae</i> - <i>Xenorhabdus bovienii</i> .....	22
Otros metabolitos producidos por <i>X. bovienii</i> .....	26
2.2 <i>Fusarium</i> spp. ....	27
2.2.1 Métodos de control de <i>Fusarium</i> spp. ....	29
3. HIPOTESIS.....	30
3.1 HIPÓTESIS GENERAL.....	30
3.2 HIPÓTESIS ESPECÍFICAS.....	30
4. OBJETIVOS.....	31
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	31
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
5. METODOLOGÍA .....	32
5.1 OBTENCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS OBJETO DE LA INVESTIGACIÓN .....	32
5.1.1 Aislamientos de hongos rizósfericos en la búsqueda de <i>Fusarium</i> spp con capacidad patogénica en tomate.....	32
5.1.1.1 Pruebas para establecer patogenicidad de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp.....	35
5.1.2 Aislamiento de la Bacteria <i>Xenorhabdus bovienii</i> : .....	36
5.1.3 Obtención y mantenimiento de <i>Bacillus subtilis</i> como control para pruebas de antibiosis .....	38
5.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y EXTRACCIÓN DE METABOLITOS DE <i>X. bovienii</i> . ....	39
5.2.1. Cinética de crecimiento: .....	39
5.2.2. Extracción de Metabolitos Secundarios de <i>X. bovienii</i> : .....	40
5.2.2.1 Métodos utilizados para la extracción de metabolitos secundarios de <i>X. bovienii</i> . ....	41
5.3 RECONOCIMIENTO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE <i>X. bovienii</i> , OBTENIDOS CON DISTINTAS METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN.....	44
5.3.1 Sobre <i>B. subtilis</i> .....	44



5.3.2. Sobre aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. ....	45
5.3.2.1 Cambios en la esporulación y formación de clamidosporas de los seis aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. ....	46
5.4. PRUEBAS DE FITOTOXICIDAD EN TOMATE CON LOS METABOLITOS OBTENIDOS POR LAS DIFERENTES METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN .....	47
6. RESULTADOS .....	48
6.1. OBTENCIÓN DE MICROORGANISMOS OBJETO DE LA INVESTIGACIÓN .....	48
6.1.1 Aislamientos de hongos rizoféricos en la búsqueda de <i>Fusarium</i> spp con capacidad patogénica en tomate .....	48
6.1.1.1. Pruebas para establecer patogenicidad de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp.....	51
6.1.2 Aislamiento de la Bacteria <i>Xenorhabdus bovienii</i> .....	53
6.1.3 Obtención y Mantenimiento de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> como blanco para pruebas de antibiosis .....	53
6.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y EXTRACCIÓN DE METABOLITOS DE <i>X. bovienii</i> .....	54
6.2.1 Cinética de crecimiento .....	54
6.2.2 Metabolitos Secundarios de <i>X. bovienii</i> cultivado en biorreactor mediante diferentes metodologías de extracción.....	55
6.3 RECONOCIMIENTO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE <i>X.bovienni</i> , OBTENIDOS CON LAS DISTINTAS METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN.....	58
6.3.1. Sobre <i>B. subtilis</i> . ....	58
6.3.2. Sobre aislamientos de <i>Fusarium</i> spp .....	63
6.3.2.1 Cambios en la esporulación y formación de clamidosporas de los seis aislamientos de <i>Fusarium</i> spp.....	67
6.4. PRUEBAS DE FITOTOXICIDAD EN TOMATE CON LOS METABOLITOS OBTENIDOS A PARTIR DE <i>X. bovienii</i> POR LAS DIFERENTES METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN .....	70
7. DISCUSIÓN .....	72
7.1 LA BÚSQUEDA DE <i>Fusarium</i> spp, <i>B. subtilis</i> y <i>X. bovienii</i> .....	72
7.2. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>X. bovienii</i> Y EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR DIFERENTES METODOLOGÍAS .....	74
7.3 RECONOCIMIENTO DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE LOS METABOLITOS EXTRAÍDOS DEL CULTIVO DE <i>X. bovienii</i> sobre <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Fusarium</i> spp. ....	77
7.4. EFECTO FITOTÓXICO DE LOS METABOLITOS EXTRAÍDOS DE <i>X. bovienii</i> SOBRE TOMATE <i>Solanum lycopersicum</i> L., VARIEDAD SANTA CLARA.....	80

8. CONCLUSIONES .....	82
BIBLIOGRAFIA.....	83
ANEXOS .....	95

## INDICE DE FIGURAS

PÁG.

FIGURA 1. MUNICIPIOS DEL VALLE DEL CAUCA DONDE SE TOMARON MUESTRAS DE PLANTAS DE TOMATE CON POSIBLES SÍNTOMAS DE ATAQUE DE <i>FUSARIUM</i> SPP .....	33
FIGURA 2. PLANTA DE TOMATE CON POSIBLES SÍNTOMAS DE ATAQUE DE <i>FUSARIUM</i> SPP. A NIVEL DE TEJIDO VASCULAR. ....	34
FIGURA 3. MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE HONGOS FITOPATÓGENOS PRESENTES EN LA RIZÓSFERA .....	35
FIGURA 4. LARVAS DE <i>G. MELLONELLA</i> , INFECTADAS CON <i>S. FELTIAE</i> . ....	37
FIGURA 5. TOMA DE LA MUESTRA DE HEMOLINFA.....	38
FIGURA 6. BIOFERMENTADOR UTILIZADO EN EL SEGUIMIENTO DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>X. BOVIENII</i> .....	40
FIGURA 7. ROTAVAPOR UTILIZADO EN LAS LABORES DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	42
FIGURA 8. COLUMNA PARA CROMATOGRAFÍA. ....	43
FIGURA 9. GAMA DE COLORES Y CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO DE ALGUNAS DE LAS COLONIAS DE <i>FUSARIUM</i> SPP SEMBRADAS EN PDA.....	50
FIGURA 10. CARACTERÍSTICAS ENCONTRADAS EN LAS COLONIAS DE <i>FUSARIUM</i> SPP A) MICELIO (10x) B) MICROCONIDIAS Y MACROCONIDIAS (10x) D) MACROCONIDIAS (40x) Y D) CLAMIDOSPORAS(10x).....	50
FIGURA 11. PORCENTAJE DE LESIONES CAUSADAS POR LOS TRECE AISLAMIENTOS DE <i>FUSARIUM</i> SPP N PRUEBAS DE PATOGENICIDAD EN SEMILLAS DE TOMATE. ....	51
FIGURA 12. DETALLES DE LAS LESIONES CAUSADAS POR ALGUNOS DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>FUSARIUM</i> SPP EN LAS PRUEBAS DE PATOGENICIDAD, A Y B) SE OBSERVA QUE LAS SEMILLAS, A PESAR DE HABER GERMINADO, CARECEN DE HOJAS PRIMARIAS, C) EL MICELIO DEL HONGO <i>FUSARIUM</i> CUBRE LA RADÍCULA EMITIDA POR LA SEMILLA, EL AISLAMIENTO CORRESPONDE A GUM1R2. ....	52
FIGURA 13. CRECIMIENTO DE <i>X. BOVIENII</i> EN MEDIO NBTA, MOSTRANDO LAS DOS FASES FI Y FII .....	53
FIGURA 14. CURVA DE CRECIMIENTO DE LA BACTERIA <i>X. BOVIENII</i> EN CONDICIONES DE BIORREACTOR DURANTE 96 HORAS DE CULTIVO CONTINUO (MARTÍNEZ, 2010). ....	54
FIGURA 15. PROCESO DE SEPARACIÓN DE LA FASE ORGÁNICA. A= CENTRIFUGADO; B= DECANTACIÓN Y DESECHO DE CÉLULAS; C Y D= EXPOSICIÓN A ETIL ACETATO; E= SECADO Y FILTRADO; F= PASO POR ROTAVAPOR; G= CONCENTRADO DE METABOLITOS A REFRIGERAR. ....	57
FIGURA 16. HALOS DE INHIBICIÓN EN EL CRECIMIENTO DE <i>B. SUBTILLIS</i> EN LA INTERACCIÓN TIEMPO POR CONCENTRACIÓN. ....	62
FIGURA 17. HALOS DE INHIBICIÓN (CM) OBSERVADOS EN EL CRECIMIENTO DE <i>B. SUBTILLIS</i> CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COMPUESTOS ORGÁNICOS EXTRAÍDOS, A LA HORA 40 DE INCUBACIÓN EN EL BIORREACTOR. ....	63
FIGURA 18. TENDENCIAS OBSERVADAS EN EL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS METABOLITOS EXTRAÍDOS SOBRE LA INHIBICIÓN (CM) DEL CRECIMIENTO DE SEIS AISLAMIENTOS DE <i>FUSARIUM</i> SPP. ....	66
FIGURA 19. PROMEDIOS DE HALOS DE INHIBICIÓN (CM) DE <i>FUSARIUM</i> SPP EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE OBTENCIÓN DE LOS METABOLITOS A TRAVÉS DE LAS DIFERENTES METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN. ....	67
FIGURA 20. <i>FUSARIUM</i> SPP CRECIENDO EN DOS MEDIOS A) CLA Y B) SNA.....	68
FIGURA 21. EFECTO DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LOS METABOLITOS OBTENIDO DEL CULTIVO DE <i>X. BOVIENII</i> EN DIFERENTES TIEMPOS DE MUESTREO Y METODOLOGÍAS, DESARROLLO DE PLÁNTULAS A LOS 10 DÍAS DE INOCULADAS CON LOS METABOLITOS. ....	71
FIGURA 22. DIAGRAMA DE REDES TRÓFICAS Y SUS COMPONENTES A PARTIR DE LOS MATERIALES ORGÁNICOS EN EL SUELO. ....	73
FIGURA 23. TASA DE CRECIMIENTO DE <i>X. BOVIENII</i> EN BIORREACTOR POR A TRAVÉS DE 120H DE MUESTREO. ....	75
FIGURA 24. OBSERVACIÓN DE <i>XENORHABDUS BOVIENII</i> CON MICROSCOPIO ELECTRÓNICO. FORMA PRIMARIA (FI) FLAGELADA Y LA FORMA SECUNDARIA (FII). TOMADA DE FORST Y CLARKE (2002) Y REFERENCIADA EN MARTÍNEZ (2010). ....	79

## INDICE DE TABLAS

PÁG.

TABLA 1. ÍNDICE DE SEVERIDAD DE <i>FUSARIUM</i> SPP EN SEMILLAS DE TOMATE VARIEDAD SANTA CLARA (DUARTE, 2007).....	36
TABLA 2. GÉNEROS DE HONGOS ASOCIADOS A RIZOSFERA DE CULTIVOS DE TOMATE EN EL VALLE DEL CAUCA Y CAUCA (GARCÍA ET AL., 2008).....	48
TABLA 3. AISLAMIENTOS DE <i>FUSARIUM</i> SPP OBTENIDOS EN LOS MUESTREOS EFECTUADOS EN LOS DEPARTAMENTOS DEL VALLE DEL CAUCA Y CAUCA. ....	49
TABLA 4 . ANÁLISIS DE VARIANZA DEL EFECTO INHIBITORIO SOBRE <i>B. SUBTILIS</i> DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE <i>X. BOVIENII</i> ...	58
TABLA 5. PROMEDIOS (CM) DEL HALO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>B. SUBTILIS</i> COMO RESPUESTA A LA EXPOSICIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS OBTENIDOS POR LOS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN ANALIZADOS. ....	59
TABLA 6. PROMEDIOS DEL DIÁMETRO (MM) DEL HALO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>B. SUBTILIS</i> EN LA MEDIDA QUE CAMBIA LA CONCENTRACIÓN DE LOS METABOLITOS.....	60
TABLA 7. PROMEDIOS DE HALOS DE INHIBICIÓN (CM) DEL CRECIMIENTO DE <i>B. SUBTILIS</i> EN LOS DIFERENTES TIEMPOS DE EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS.....	61
TABLA 8. PROMEDIOS DE HALOS DE INHIBICIÓN (CM) DE LOS 6 AISLAMIENTOS DE <i>FUSARIUM</i> SPP EXPUESTOS A LOS METABOLITOS DE <i>X. BOVIENII</i> OBTENIDOS MEDIANTE CINCO MÉTODOS DE EXTRACCIÓN. ....	64
TABLA 9. PROMEDIOS DE HALOS DE INHIBICIÓN (CM) DE LOS 6 AISLAMIENTOS DE <i>FUSARIUM</i> SPP EXPUESTOS A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LOS METABOLITOS DE <i>X. BOVIENII</i> OBTENIDOS MEDIANTE CINCO MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	65
TABLA 10. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA DETECTAR POSIBLES CAMBIOS EN MICRO, MACROCONIDIAS Y CLAMIDOSPORAS DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>FUSARIUM</i> ENFRENTADOS A LOS METABOLITOS OBTENIDOS POR LAS DIFERENTES METODOLOGÍAS UTILIZADAS. ....	68
TABLA 11. INFLUENCIA DE LOS DOS MEDIOS DE CULTIVO PROBADOS EN LA EXPRESIÓN DE MACRO, MICROCONIDIAS Y CLAMIDOSPORAS DE LOS SEIS AISLAMIENTOS DE <i>FUSARIUM</i> SPP. ....	69
TABLA 12. INFLUENCIA DEL TIEMPO (H) DE EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE MACRO, MICROCONIDIAS Y CLAMIDOSPORAS DE LOS SEIS AISLAMIENTOS DE <i>FUSARIUM</i> SPP.....	70

INDICE DE ANEXOS

	PÁG.
ANEXO A. SERIES DE DILUCIÓN DE HONGOS EXTRAÍDOS DE CAMPO. ....	95
ANEXO B. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA VARIABLE HALO DE INHIBICIÓN (cm) DE SEIS AISLAMIENTOS DE FUSARIUM SPP COMO RESPUESTA A METABOLITOS SECUNDARIOS DE X. BOVIBENII OBTENIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN, TIEMPOS Y CONCENTRACIONES. ....	96
ANEXO C. PROMEDIOS DE HALOS DE INHIBICIÓN (cm) DE LOS 6 AISLAMIENTOS DE FUSARIUM SPP ENFRENTADOS A LOS METABOLITOS EXTRAÍDOS EN DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACIÓN DE X. BOVIENII.....	97

## RESUMEN

*Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae) es simbiote del nematodo entomoparásito *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934, Cephalobina, Steinernematidae) y sus metabolitos se consideran promisorios en el control biológico de patógenos como *Fusarium* spp, que ocasiona considerables pérdidas económicas en tomate *Solanum lycopersicum* L. en el Valle del Cauca. Esta investigación se realizó con el fin de evaluar la actividad antimicrobiana de algunos metabolitos secundarios de esta bacteria sobre aislados de *Fusarium* spp, hongo fitopatogeno limitante para la producción de tomate.

Se tomaron muestras de tejido de tomate con posibles síntomas de *Fusarium* spp. en varias localidades del Valle del Cauca. Se aislaron cepas de *Fusarium* spp, cuya patogenicidad fue verificada en semillas de tomate variedad Santa Clara. Al mismo tiempo se hicieron cultivos puros de *X. bovienii* a partir de larvas de *Galleria mellonella* infectadas con *Steinernema feltiae* para asegurar la presencia de la bacteria. También se dispuso de un cultivo puro de *Bacillus subtilis*, registrado como agente microbiano altamente sensible a metabolitos de *X. bovienii*. La obtención de estos cultivos microbianos facilitó el conocimiento sistematizado de distintos investigadores en diferentes partes del mundo.

En un biorreactor de 3L con medio de cultivo NBTA se estableció la cinética de crecimiento de *X. bovienii* (Martínez, 2010) en intervalos de muestreo de 4 h durante 96 h de cultivo. A partir de allí se extrajeron los metabolitos secundarios por seis metodologías: extracción de compuestos orgánicos, de proteínas, compuestos de Indol, metanol, columna para cromatografía y con butanol ( Xu, 1998; Webster y Chen 1998; Cabral *et al.*, 2004, Torrenegra y Baquero, 2005; Vela, *et. al.*, 2009).

Los metabolitos extraídos en los diferentes tiempos de muestreo del cultivo de *X. bovienii* se enfrentaron con los aislamientos de *Bacillus subtilis* y *Fusarium* spp, evaluando su acción inhibitoria a diferentes concentraciones (100, 75, 50 y 25%). La respuesta se estableció con base al halo de inhibición (cm) de los dos microorganismos y para *Fusarium* spp además, se analizó el efecto de estos metabolitos sobre la producción de macro, microconidias y clamidosporas. Los ensayos que se realizaron se ajustaron a un diseño completamente al azar y se analizaron mediante el uso del programa SAS ® 9.2, cuando se detectaron diferencias significativas se acudió a la prueba de Duncan. También se efectuaron pruebas de fitotoxicidad sobre semillas y plántulas de tomate.

Del suelo y rizosfera del cultivo del tomate se aislaron distintos géneros fungos que hacen parte de grupos funcionales que cumplen diferentes actividades en el suelo. Se lograron trece (13) aislamientos de *Fusarium* spp de los cuales seis (6)

presentaron alta incidencia y severidad en pruebas de patogenicidad sobre semillas de tomate. A intervalos de muestreo de 4 h durante 96 h de cultivo, *Xenorhabdus bovienii* mostró su mayor crecimiento en medio NBTA, en las primeras 16-20 horas de incubación hasta las 40 h, tiempos coincidentes con la máxima producción de metabolitos secundarios obtenidos por seis metodologías de extracción.

Los metabolitos de *X. bovienii* obtenidos a través de las seis metodologías probadas, con excepción de la extracción con proteínas, inhibieron el crecimiento de *B. subtilis* y de los aislamientos de *Fusarium* spp. Aunque los resultados variaron entre aislamientos fungosos, las mayores inhibiciones ocurrieron cuando los metabolitos se extrajeron con butanol y con compuestos orgánicos

En ambos microorganismos, los mayores halos de inhibición ocurrieron cuando el tiempo de incubación al cual se extraían los metabolitos no superaba las 40 h y la concentración era del 100%. En los aislamientos de *Fusarium* spp además de inhibirse el crecimiento micelial, también disminuyó significativamente la presencia de macro, microconidias y clamidosporas. En los ensayos con semillas y plántulas no se observaron efectos fitotóxicos de los metabolitos obtenidos mediante las diferentes metodologías empleadas.

Los costos económicos de la tecnología de extracción de los metabolitos de *X. bovienii*, aunados a la complejidad de la respuesta inhibitoria en los diferentes aislamientos de *Fusarium* spp, hacen recomendable, a corto plazo, la investigación y uso con fines de biocontrol.

Palabras Claves: Metabolitos Secundarios, *Xenorhabdus bovienii*, *Fusarium* spp., *Bacillus subtilis*., Control Biológico.

## ABSTRACT

*Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae) is the nematode symbiont entomoparasite Steinernemafeltiae (Filipjev, 1934, Cephalobina, Steinernematidae) and its metabolites are considered promising in the biological control of pathogens such as *Fusarium* spp, which cause considerable economic losses in tomato *Solanum lycopersicum* L in Valle del Cauca. This research was conducted with the aim of evaluating the antimicrobial activity of some secondary metabolites of the mentioned bacteria over isolated from *Fusarium* spp, limiting for the tomato production.

Samples from the crop with potential *Fusarium* spp attack symptoms were taken in several places in Valle del Cauca, fungal flora associated with them in search of *Fusarium* spp was isolated, and with the isolated pathogenicity samples on tomato seed variety Santa Clara tests were performed. At the same time pure cultures of *X. bovienii* were made from larvae *Galleria mellonella* infected with *S. feltiae* in order to ensure the presence of the bacteria. Also, a pure culture of *Bacillus subtilis* was used and registered as highly sensitive microbial agent to metabolites of *X. bovienii*. Obtaining these microbial cultures was facilitated by the systematic knowledge of several researchers in different parts of the world.

In a 3L bioreactor with culture medium NBTA, the kinetics of growth of *X. bovienii* was established on sampling intervals of 4 h during 96 h from cultivation. From there, the secondary metabolites were extracted by six methods: extraction of organic compounds, proteins, indol compounds, methanol, column for chromatography and with butanol (Xu, 1998, Webster and Chen 1998, Cabral et al., 2004, Torrenegra and Baquero, 2005, Vela, Leguizamo and Parada, 2009; Vela, 2010).

The metabolites extracted at different sampling times of growing *X. bovienii* faced with the *Bacillus subtilis* isolates and *Fusarium* spp, questioning its inhibitory action at different concentrations of them (100, 75, 50 and 25%). The response was established in terms of inhibition zone (mm) of the two microorganisms and for *Fusarium* spp, moreover, the effect of these metabolites on the production of macro, microconidia and chlamydospores was analyzed. Trials conducted adjusted to a completely randomized design and were analyzed using the SAS Programs ® 9.2. When significant differences were detected Duncan tests were performed. Also phytotoxicity tests were conducted on seeds and tomato seedlings. Different fungus genres were isolated from the soil and rhizosphere of tomato crop which make part of functional groups that perform different activities on the ground.

Thirteen (13) isolates of *Fusarium* spp were achieved from which six (6) showed a high incidence and severity in pathogenicity tests on tomato seeds.



At sampling interval of 4 h during 96 h of culture, its fastest growing *Xenorhabdus bovienii* showed its higher growing in NBT medium, in the first 16-20 hours of incubation to 40 h, times that coincide with the maximum production of secondary metabolites obtained by six extraction methods.

The metabolites of *X. bovienii* obtained through six tested methodologies, except for protein extraction, inhibited the growth of *B. subtilis* and *Fusarium* spp isolates. Although results varied among fungus isolates, the greatest inhibition occurred when the metabolites were extracted with butanol and organic compounds.

In both organisms, the largest halos of inhibition occurred when the incubation time at which the metabolites were extracted did not exceed the 40 h and the concentration was 100%. In the *Fusarium* spp isolates besides the inhibition of the mycelial growth, the presence of macro-and microconidia clamidosporas was also significantly reduced. In trials with seeds and seedlings phytotoxic effects were not observed in relation to the metabolites obtained by the different methodologies used.

The economic costs of the extraction technology of the metabolites of *X. bovienii*, as well as the complexity of the inhibitory response in the different isolates *Fusarium* spp, make it advisable, in short-term, the research and use of biocontrol purposes, culture medium where the bacterium was incubated with all its components, given the potential biocontrol.

Key Words: Secondary, Metabolites, *Xenorhabdus bovienii*, *Fusarium* spp., *Bacillus subtilis*., Biological Control.

## INTRODUCCIÓN

Las plagas y agentes patógenos de los cultivos, han causado grandes pérdidas económicas y humanas a lo largo de la historia. Algunos de ellos han tenido profundo impacto en la sociedad con consecuencias como hambre, desnutrición, migración y muerte de personas y animales. Como ejemplo de estas epidemias se tiene la llamada “hambruna Irlandesa”, ocurrida en 1845 cuando un ataque generalizado por el agente patógeno *Phytophthora infestans*, agente causal del tizón tardío destruyó los cultivos de papa en esa parte del mundo (Xu, 1998, Agencia de Noticias UN, 2011).

Se puede concluir que las enfermedades han influenciado en variados y diversos aspectos, el desenvolvimiento de la humanidad, y el progreso económico y social de cada país (Buritica 1999, Agencia de Noticias UN, 2011). Los insectos, hongos y las llamadas “malas hierbas” por algunos y plantas acompañantes por otros, son algunas de las principales causas de pérdida de rendimiento en la agricultura a nivel mundial (Agencia de Noticias UN, 2011).

Las enfermedades de origen micótico constituyen una de las causas más importantes de pérdidas. Entre los agentes fúngicos que las producen se desatacan aquellos que lesionan directamente el sistema radical, invadiendo en ocasiones hasta el cuello de la planta o actúan segregando toxinas que alteran la permeabilidad de la membrana celular (Lozano, 2008) el suelo, también es el hábitat temporal de formas resistentes de muchos hongos, que afectan de igual forma la parte aérea de la planta (Dall-Bello, 1998).

Los suelos se han utilizado históricamente para fines agrícolas en siembras de cultivos como caña de azúcar, café, frutales y algunas hortalizas entre otros, importantes para la economía de la región y del país. Dentro de las hortalizas, se destaca la producción de cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Gobernación Valle del Cauca, 2005 y 2008), adicionalmente, la infraestructura vial y portuaria es adecuada para el abastecimiento a diferentes zonas del territorio local, nacional y a países extranjeros (CCI 2006, 2010).

Según la Secretaría de Planeación Departamental del Valle, dentro de los cultivos que marcaron la tendencia del sector agrícola durante el año 2000 las hortalizas ocuparon el cuarto lugar con el 1% de las áreas sembradas. Sin embargo, los cultivos de hortalizas, raíces y tubérculos, fueron los más afectados por la apertura económica (Gobernación del Valle del Cauca 2005, 2008).

Las hortalizas presentaron alta reducción en el área sembrada y cosechada debido a que de los ocho productos que conforman este grupo, 4 registraron variaciones negativas, entre los que cabe destacar el área cultivada con tomate, pues presentó una reducción del 9.55% (CCI, 2006). Durante ese año la decisión

de siembra de esta hortaliza fue diferente en los diversos municipios productores, mientras que en algunos como Toro, la Unión y Darién el área sembrada aumentó, disminuyó en otros como: Restrepo, Buga, La Cumbre, El Cerrito, Jamundí y Palmira (Gobernación del Valle del Cauca 2005, 2008).

Esta decisión estuvo mediada principalmente por el incremento en los problemas fitosanitarios: trips, gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*), mancha de la hoja y el fruto (*Xanthomonas vesicatoria*) y pudrición de la raíz (*Phythium arrhenomantes*), entre otros comunes en este cultivo (Buriticá, 1999; Rodríguez, 2002).

En municipios como Trujillo y Caicedonia, se disminuyó el área sembrada, por la necesidad de rotación de cultivos, época de lluvias, elevados costos de producción y los altos riesgos del cultivo (Buriticá, 1999, Collar, Gálvez y Mating, 2002). En general, aunque los agricultores se sienten inclinados hacia la siembra de tomate por la gran demanda y precios que puede alcanzar su cosecha, se lo considera un cultivo altamente riesgoso en términos económicos, dada la alta incidencia de diversos patógenos, entre los que se incluyen nematodos, hongos y artrópodos, lo cual ha conducido al incremento en el uso de productos de síntesis química para su control, acompañado del deterioro y desestabilización en el funcionamiento de las redes tróficas en el suelo, particularmente. De acuerdo con lo anterior, y dados los perjuicios ocasionados por el exceso en el uso de agroquímicos, surge la necesidad de desarrollar estrategias que replacen o disminuyan la aplicación de dichos productos (Uribe, 2007).

Estas estrategias contemplan la incorporación de microorganismos que actúan como controladores y antagonistas biológicos (Uribe, 2007; LI, Hu y Webster, 1998). Dentro de estos organismos se destacan *Trichoderma* spp (Sánchez, 2005) que actúa como antagonista de hongos fitopatógenos de raíz; ácaros pertenecientes a las familias *Phytoseiidae* y *Tetranychidae* entre otras, predadores de ácaros (Melo, comunicación personal., 2007) y también nematodos entomoparásitos que controlan insectos barrenadores de raíz y tallos que actúan igualmente como antagonistas de nematodos fitoparásitos (Parada, Luque y Piedrahita., 2006).

En este grupo se encuentra el nematodo entomoparásito *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) (Cephalobina: *Steinernematidae*) cepa Colombia (Parada, 1998), el cual establece simbiosis con la bacteria *Xenorhabdus bovienii*, encargada de metabolizar el contenido celular de las larvas de los insectos parasitados y convertirlo en caldo de cultivo del cual se alimenta el nematodo entomoparásito y, al mismo tiempo, de mantener las condiciones del medio asépticas para que el nematodo se establezca sin mayor competencia. Para ello posee un sistema enzimático a través del cual produce metabolitos secundarios, los cuales además de intervenir en las actividades anteriormente mencionadas, algunos tienen carácter antibiótico contra diferentes patógenos del suelo (Abelleira, 2010).

Esto hace que la presente investigación, se detenga en dichos metabolitos y plantee su estudio como una de las posibles estrategias de control biológico para agentes causales de enfermedades en plantas de importancia como *Fusarium spp* y *F. oxysporum*, entre otros (Sánchez de P., Parada y Jiménez, 2010).

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro de los cultivos de hortalizas de mayor importancia económica en el Valle del Cauca, se encuentra el tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Sin embargo, su establecimiento como monocultivo, ha incidido en problemas fitosanitarios tales como: bacterias, virus, hongos y nematodos fitoparásitos, cuyo manejo incrementa considerablemente los costos de producción (Gobernación del Valle, 2008; INFOAGRO, 2011).

En el cultivo de tomate, se han registrado como enfermedades importantes las causadas por hongos, con afecciones en las raíces, tallo, hojas, flores y frutos, afectando el crecimiento y productividad del cultivo. Entre estos hongos se encuentran varias especies de *Fusarium* spp., este microorganismo puede permanecer en el suelo durante muchos años por formar estructuras de resistencia como son las clamidosporas que al germinar inician la infección a través de las raíces hasta afectar el sistema vascular de la planta; infección que se puede manifestar incluso desde las primeras etapas fenológicas del cultivo. (Buriticá, 1999; Apablaza, 1999; Pereyra y Dill-Macky 2010).

El manejo convencional de estos patógenos, se realiza a través de la aplicación insumos de síntesis química. El cual es cada día más difícil, por el fenómeno de resistencia que desarrollan estos microorganismos ante el uso continuo de fungicidas, los altos costos que genera su aplicación, los riesgos para la salud humana y ambiental. Por esta razón, cada vez se hace más urgente el uso de medidas alternas como es el control biológico de enfermedades, teniendo en cuenta que estos bioreguladores han mostrado que pueden ser una alternativa para el manejo de estos patógenos; por la producción de metabolitos secundarios generados por estos microorganismos o en sus simbioses que afectan el desarrollo normal de otros microorganismos, además, estos metabolitos pueden ser aislados y multiplicados (Xu, 1998; Martínez, 2010).

Los metabolitos secundarios de fermentaciones microbianas, ofrecen una fuente potencial de componentes bioactivos para el control de enfermedades en los cultivos agrícolas. Los japoneses han usado especies de *Streptomyces* para producir y comercializar metabolitos secundarios para el control de la mancha del arroz, extraídos de diferentes especies, tales como kasugamicina (*S. kasugaensis*), polioxinas (*S. cacaor*), validamicina (*S. hygrosopicus*) y natamicinas (*S. natalensis* y *S. chattanoogensis*). Otros organismos que han recibido recientemente atención, son especies de bacterias simbioses de nematodos entomoparásitos, *Steinernema* sp. y *Heterorhabditis* sp., en los cuales se han explorado sus metabolitos secundarios como potenciales controladores biológicos de fitopatógenos y fitoparásitos (Thaler, Duvigidan and Boemere, 1998; Webster, Li y Chen; 1998; Gregson y McInerney, 1998; Vergara, 2010).

Aunque en Colombia, en la última década ha crecido el interés y demanda hacia el uso de los nematodos entomoparásitos para el control de plagas (Melo y Gaigl, 2004; Parada *et al*, 2005; López J.C., 2005; Melo *et al*, 2005, Sáenz, 2005; Leguízamo, Parada y Piedrahita, 2006; Molina 2007), no se ha explorado la actividad antimicrobiana de las bacterias asociadas a estos biocontroladores: *Xenorhabdus* sp., y *Photorhabdus* sp., simbioses de *Steinernema* sp y *Heterorhabditis* sp, respectivamente.

Dentro de este contexto, la presente investigación busca generar información y contribuir al desarrollo en el país de esta alternativa de control biológico de enfermedades. Por esta razón, se obtendrán metabolitos secundarios producidos por aislamientos de la bacteria *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae), simbiote del nematodo entomoparásito *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) (Cephalobina: Steinernematidae) cepa Colombia, a fin de evaluar su actividad sobre *Fusarium* spp. patógeno de importancia en el cultivo de tomate.

El desarrollo de este trabajo constituyó parte del macroproyecto: “Escalado y Formulación Industrial de *Steinernema feltiae* (Cephalobina: Steinernematidae) Cepa Colombiana y su bacteria Simbiote *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae) para el control de insectos y fitopatógenos” avalado por Colciencias y fue financiado por el proyecto mencionado y por la División de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia, Palmira (DIPAL).

## 2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

### 2.1 SIMBIOSIS *Steinernema feltiae* - *Xenorhabdus bovienii*

Los nematodos entomoparásitos del género *Steinernema* están registrados como alternativa promisorio para el control de insectos perjudiciales en diferentes cultivos (Maxwell *et al.*, 1994, Fodor A., 2010), principalmente aquellos que habitan o tienen una fase de su ciclo de vida en el suelo (Parada, Luque y Piedrahita, 2006).

Para Colombia se han identificado las especies *Steinernema feltiae*, *Steinernema cubanum*. y *Steinernema cariocapense*, entre otros; en suelos cultivados con papa, en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá, reportadas por primera vez en el país (Parada J.C.,1998). La relación *Steinernema feltiae*- *Xenorhabdus bovienii* se considera como simbiosis mutualista obligada, porque la bacteria no puede penetrar dentro del hemocoele de los insectos hospederos sin el nematodo y, los nematodos no pueden crecer, alimentarse y reproducirse en ausencia de la bacteria *x. bovienni* (Georgis y Poinar, 1994; Sagarra *et al.*, 2000; Martínez J. 2010). Este único y doble carácter del complejo nematodo-bacteria, los distingue de otros organismos utilizados para control biológico (Parada, Luque y Piedrahita, 2006 Abelleira 2010).

El ciclo de vida de la bacteria y el nematodo han sido ampliamente documentados por Akhurst y Boemare, (1990); Kaya y Gaugler, (1993) y para la cepa Colombia por Triviño, Luque y Parada, 2006 y Martínez J. 2010. En diferentes partes del mundo, varias especies de *Steinernema feltiae* han recibido considerable atención como bioinsecticidas, por la combinación única de los atributos que poseen como la presencia de un amplio rango de hospederos, habilidad para buscar e introducir sus bacterias simbiotas dentro del cuerpo del insecto, matándolo por septicemia dentro de las 24-48 horas siguientes. Cuando los insectos son invadidos por un cuerpo extraño, en este caso las bacterias simbiotas del nematodo, se generan reacciones inmunológicas, presentadas en la hemolinfa como defensa celular y humoral, ocurre inhibición en su desarrollo y reproducción (Boemare, Laumond and Maulen 2007; Li, Hu y Webster, 1998; Molina, 2007; Chavarria-Hernandez, 2008).

Dentro del ciclo de vida del nematodo, existe un estadio infeccioso, este es un factor muy importante para la inclusión en programas de manejo de insectos en diversos cultivos, además del tema de bioseguridad en relación con mamíferos, plantas y entomofauna benéfica (Gaugler y Georgis, 1991; Molina 2007). Dicho estadio infeccioso, permite ser utilizado y desarrollado fácilmente a escala, en medios artificiales, sólidos o líquidos, que pueden ser almacenados por largos períodos y, sin embargo, mantener la viabilidad y patogenicidad de la bacteria, an

a temperatura ambiente (14°C) o en refrigeración. E igualmente, ser aplicados por métodos convencionales (Poinar, 1990; Kaya, 1990; Parada, *et.al.*, Martínez, 2005, Chavarria- Hernandez *et al.*, 2008).

Dentro de las explicaciones a la capacidad de control biológico del complejo *Steinernema feltiae*- *Xenorhabdus bovienii*, se ha establecido que la bacteria produce metabolitos secundarios involucrados en esta actividad. A diferencia de los metabolitos primarios, los metabolitos secundarios no son esenciales para el crecimiento del organismo que los posee, pero actúan como alternativas de defensa y comunicación con otras especies, contribuyendo a la supervivencia del mismo. Muchos de los microorganismos que producen metabolitos secundarios poseen una compleja diferenciación morfológica (Sutton, 1996; Torrenegra y Baquero, 2005) reconociéndose los metabolitos secundarios para microorganismos como sustancias con propiedades antibióticas, que se diferencian de los metabolitos primarios porque estos últimos son necesarios para cumplir funciones como crecimiento (Patiño, 2011).

Como se afirmó con anterioridad, *X. bovienii* como simbiote de *S. feltiae* garantiza la acción letal del nematodo en el insecto hospedante (Triviño, Parada y Luque, 2006; Martínez 2010), estas bacterias se caracterizan por pertenecer al grupo de los bacilos Gram negativos (G-), son bacterias aerobias, pues necesita el oxígeno para vivir, formar productos y para su mantenimiento celular (Gauthier, Thibault y Leduy 1991).

Para *X. bovienii* cepa Colombia se han registrado tamaño celular aproximado de 0.3- 2 µm de ancho y 2 µm de largo, con presencia de motilidad (Triviño, Parada y Luque 2006; Martínez, 2010). Se caracteriza por formar colonias con coloraciones entre blancas y amarillas-café en agar nutriente y presentar cuerpos cristalinos de inclusión. La temperatura ideal para su desarrollo es de 37°C (Parada, Luque y Piedrahita, 2006). Tienen actividad enzimática catalasa negativa, oxidasa negativa, no reducen nitrato, no son bioluminiscentes, son proteasa positiva, no forman esporas y por tanto no poseen un estado resistente al ambiente (Parada, Luque y Piedrahita, 2006; Rodríguez, 2007).

Estas bacterias muestran pleomorfismo, es decir formas diferentes de la colonia y variación de fase, de FI (forma primaria) a FII (forma secundaria), la bacteria en FI, provee los nutrientes esenciales para los nematodos, produciendo un amplio espectro de agentes antimicrobianos y toxinas, las cuales son las responsables de la degradación y muerte del insecto hospedero, presentan flagelos, se producen también en esta fase enzimas que se encargan de la descomposición de las proteínas, carbohidratos y lípidos al interior del hospedante (Boemare y Akhurst, 1988).

El segundo estado (FII), no tiene flagelos y suele presentarse cuando la bacteria se multiplica dentro del hemocelo, tras la penetración y su liberación por parte del



juvenil infectivo en el insecto. Se observa también, en cultivos *in vitro* prolongados. Aunque se ha comprobado que algunas cepas bacterianas en FI tienen acción insecticida, éstas son menos efectivas y proveen menos fuente de alimentación al nematodo cuando se encuentran en cultivos *in vitro* (Boemare y Akhurst, 1988).

La variación entre fases puede ser fácilmente detectada por la adsorción de colorantes y la producción de antibióticos de la bacteria simbiote. Las bacterias en FI forman colonias pequeñas en medios con agar, adsorben el rojo neutral en agar McConkey y el azul de bromotimol y degradan el cloruro de trifeniltetrazolio. Adicionalmente, en FI se desarrollan grandes cuerpos de inclusión (cristales proteicos). La Fase II es igualmente productora de antibióticos, pero no adsorbe tintes, no se encuentran inclusiones cristalinas, las colonias son más grandes y se tiñen de rojo al degradarse el cloruro de trifeniltetrazolio cuando se encuentra presente en el medio (Ensign., 2000; Martínez, 2010).

Se ha registrado que la fase primaria (FI) es de vital importancia en el proceso patológico y requiere factores específicos para su multiplicación (Ehlers, 2001; Triviño *et al.*, 2006), se caracteriza por la producción de antibióticos, en la fase FI las bacterias se pueden aislar de los insectos infectados con nematodos y, de forma directa, de los estados juveniles infectivos del nematodo (Huet *et al.*, 1997, Martínez, 2010). Es en esta FI, donde la bacteria, provee los nutrientes esenciales para los nematodos, por la muerte que propicia del insecto, produciendo al mismo tiempo un amplio rango de agentes antimicrobianos, entre ellos, variedad de antibióticos de amplio espectro, para proteger el cadáver de ataques de organismos oportunistas. (Thaler 1997; Triviño, Parada y Luque, 2006; Molina, 2007).

Se considera de forma general, que la razón para la producción de antibióticos en la FI, se debe a que dichos antibióticos ayudan a mantener un ambiente óptimo para el desarrollo del nematodo dentro del cadáver relativamente “libre” de la competencia de otras bacterias, hongos e incluso de otras especies de nematodos (Paul *et al.*, 1988; Hu, Li y Webster 1999; Webster, Chen y Li 1998; Park and Kim, 2005; Triviño, parada y Luque, 2006). En cultivos *in vitro* de la bacteria creciendo en condiciones aeróbicas, también, se ha detectado la presencia de antibióticos (Xu, 1998; Park and Kim, 2005). En cultivo artificial, la bacteria en FI también produce combinación de proteasas, lipasas, quitinasa y lecitinasa (Akhurst y Boemare, 1990).

Para cualquiera de las aislados de la bacteria simbiote asociada a los diferentes *Xenorhabdus*, solo la FI ha sido aislada directamente de nematodos nativos (Parada, Luque y Pihedrahita, 2006.), ya que la FII, sólo surge durante la fase estacionaria, en cultivo *in vitro* o durante la reproducción del nematodo en dietas artificiales (Triviño, Parada y Luque 2006; Reyes 2003; Park and Kim, 2005; Chavarria- Hernández, 2008).

Una característica importante del fenómeno biológico conformado por este complejo trifásico nematodo-bacteria-insecto, es que las bacterias producen una variedad de antibióticos tanto *in vitro* como en condiciones *in vivo* (Li, Hu y Webster 1998; Xu.,1998; Salas-Luevano, Rebolledo y Molina, 2001; Rodríguez 2007; Park and Kim, 2005; Chavarria- Hernandez, 2008).

Efectivamente, las especies bacterianas (Enterobacterias) como *Xenorhabdus*, se han registrado como fuentes naturales de nuevos antibióticos, como Indoles, Xenorhabdinas y Xenocumacinas, con espectro de uso tanto para humanos como para cultivos agrícolas y forestales. Se ha señalado como ventaja que, algunos de estos, son más eficaces que muchos de los que actualmente se encuentran en uso en el mercado y, que, además, su estructura química no está relacionada con los antibióticos actuales, tanto los de uso médico como agronómico, lo cual amplía las posibilidades de utilización en el tiempo (Boyce J.M. 1995; Chavarria-Hernandez, 2008).

Por ejemplo, algunos metabolitos secundarios con propiedades antibióticas derivados de especies de *Xenorhabdus*, no sólo han mostrado alta actividad contra aislados clínicos multi-resistentes a los medicamentos utilizados contra patógenos bacterianos, tales como *Staphylococcus aureus* (Li, Hu y Webster 1998; Vergara, 2004), sino que, además, se ha logrado demostrar su amplio espectro, actuando como insecticidas, nematocidas y antibacteriales para uso principalmente agrícola como fuente de control biológico (Zahner and Fiedler; 1995, Xu, 1998; Vergara 2004).

Se ha encontrado inhibición en el crecimiento de levaduras, hongos y bacterias, incluyendo varios de importancia médica y agrícola, al utilizar metabolitos secundarios producidos por esta bacteria, en caldo de cultivo o soluciones de compuestos puros (Li, Hu y Webster, 1998; Chen, Dunphy y webster, 1994, Torres, *et al.*, 2002).

Los metabolitos con actividad antibiótica, difieren en su espectro antimicrobiano (McInerney., 1991), Nematophin es activo frente a aislados clínicos pero no frente a hongos fitopatógenos como *Aspergillus fumigatus*, al contrario las Xenorxidas son activos no sólo para infecciones clínicas, sino también para hongos fitopatógenos (Xu, 1998; Wang *et al.*, 2008). Los hongos de interés agronómico que actúan como controladores de insectos, tales como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* se han confirmado como resistentes a los metabolitos producidos por *X. bovienii* (Salas-Luevano, Rebolledo, y Molina 2001).

### Otros metabolitos producidos por *X. bovienii*

Algunas enzimas tipo proteasas son secretadas por la FI de *Xenorhabdus*, mientras la FII lo hace pero en menor cantidad. El número de proteasas producidas y nivel de actividad varía entre poblaciones de los aislados. Su actividad está comprometida con la degradación de proteínas de los insectos que proveen alimento a la bacteria y al nematodo. Se han discriminado proteasas producidas por bacterias simbiotes que presentan cambios en toxicidad sobre los hospederos (Forst y Tabatai, 1997; Wang, 2011).

Dos tipos de inclusiones cristalinas proteicas (tipo I y II) se encuentran en la FI pero en la FII, es muy bajo su contenido o no se encuentran. La pérdida de estas inclusiones en FII, involucra probablemente, eventos post- transcripcionales. La función precisa de dichos cristales es desconocida, pero se registra que no presentan ninguna actividad insecticida. Las inclusiones cristalinas tipo I, las más reconocidas, corresponden a una proteína rica en Metionina de 26 kDa, mientras las inclusiones tipo II están conformadas de una proteína de 22 kDa (Ensign y Ciche, 2000).

Se ha registrado la presencia de exoenzimas elaboradas por varios aislados de *Xenorhabdus* spp, aunque su producción varía entre poblaciones aisladas. La lecitinasa, es producida por *X. nematophila* y *X. bovienii* (Thaler, 1998; Wang 2008). Más de 30 metabolitos secundarios bioactivos, han sido registrados en cultivos de *Xenorhabdus*. Incluyen puromicina y madumicina II. Las moléculas antibióticas pequeñas inhiben el crecimiento de hongos y otras bacterias, mientras que macromoléculas, como bacteriocina, inhiben el crecimiento de especies o aislados con capacidad de afección estrechamente relacionadas de *Xenorhabdus*, (Boemare, *et al.*, 1997; Burnell y Stock, 2000).

Metabolitos como Nematophin aislados y probados como antibióticos en algunas investigaciones, muestran la efectiva actividad de algunos de estos metabolitos con una concentración inhibitoria menor de 2.0 g/ml, frente a bacterias resistentes a otros antidotos, presentándose como una favorable alternativa, para la producción de medicamentos y controladores de enfermedades en las plantas (Webster Li y Chen, 1998; Li, Hu y Webster 1998; Wang, 2011). Además se considera una ventaja, su relativa facilidad de producción en medios biológicos o químicos.

Otros metabolitos estudiados como las Xenorhabdinas son comúnmente producidas por *X. bovienii*, y las Xenocumacinas por *X. nematophilus* y *X. luminescens*. Estos metabolitos no solo tienen diversa estructura química, también tienen amplia actividad de interés médico y agrícola, como antibióticos (Paul *et al.*, 1988; Hu, Li y Webster, 1999; Hu y Webster, 1998), antimicóticos (Isaacson, 1994), antibacterianos, insecticidas (McInerney, 1991), nematocidas, antivirales y anti-inflamatorios (Hu y Webster, 1998). Varios de estos compuestos

se han registrado como activos sobre un amplio espectro de patógenos de plantas y animales. Se ha encontrado que inhiben, en condiciones de laboratorio fitopatógenos como *Botrytis cinerea*, *Ceratocystis ulmii*, *Mucor pitifomis*, *Pythium coloratum*, *P. unimum*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*. En condiciones similares, hongos benéficos como *Oidiodendron griseum*, y como se mencionó, los entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopilaeno* se han registrado como afectados en presencia de estos compuestos (Chen Dunphy y Webster, 1994; Xu, 1998; Ng y Webster, 1997; Pinyon, Hing y Connor, 2010).

La diversidad de metabolitos bioactivos producidos por esta bacteria, sugiere que puede ser fuente potencial de nuevas moléculas con diferentes modos de acción a las tradicionales (Wang, 2011). Por ello, es de considerar como una necesidad urgente, este tipo de investigaciones para encontrar compuestos antimicrobianos alternos, que puedan ser insertados al mercado como alternativas limpias de control de fitopatógenos (Zahner and Fiedler, 1995; Rodríguez, 2007; Wang, 2011), a fin de disminuir o eliminar el uso de productos de síntesis química industrial que afectan en forma directa el equilibrio ecológico, principalmente en el suelo, previamente alterado por la inserción de monocultivos y prácticas de cultivo no favorables para el ambiente y los agroecosistemas (Leguizamó, Parada y Piedrahita, 2006).

## **2.2 *Fusarium* spp.**

*Fusarium* spp., es un hongo habitante hongo natural del suelo presente en la rizósfera de muchas especies de plantas, entre ellas, tomate *Solanum lycopersicum* L. Su presencia es común en áreas tanto tropicales como subtropicales, también puede habitar en zonas templadas. Está referenciado como un patógeno de amplia ocurrencia en plantas, e incluso, puede llegar a causar infecciones de forma oportunista en el hombre (Appel y Gordon, 1994; Argotti et al., 2010).

La mayoría de los aislados de *Fusarium* se comportan como saprófitos, derivando su alimento de diversos sustratos orgánicos. Sin embargo, algunos de ellos causan enfermedades en las plantas, caracterizadas por pudrición de la raíz, daño del sistema vascular, marchitez descendente en las plantas y, con frecuencia, la muerte de la planta, daños consecuentes con su penetración a la planta por la raíz y posterior movimiento hacia el xilema (HomoAgricola, 2011). Otros aislados de *Fusarium* spp son eficaces como agentes de control biológico, utilizados actualmente en programas de manejo integrado de plagas y enfermedades (MIPE), (Buriticá, 1991; Desjardins and Proctor, 2007).

El grupo *Fusarium* es muy complejo, dividido en formas especiales (Buriticá, 1991; Monroy, Lizarazo y Forero, 2010). Dentro de las especies patógenas más comunes se encuentran *F. oxysporum* acompañado de *F. solani*, *F. moniliforme* y *F. graminearum*. Estas especies, crecen fácilmente en medio PDA (papa-dextrosa-agar), el cual le ofrece nutrientes y energía necesaria para su desarrollo y crecimiento favorecidos por temperaturas que oscilan entre 25 y 28 °C. Desarrolla colonias de tipo algodonoso y planas. (Arbeláez, 2000; Desjardins and Proctor, 2007).

El color de las colonias en el medio PDA, puede variar, según la especie del hongo, se pueden ser de color blanco, púrpura, lila o café. Las hifas son septadas (Jacobson y Gordon 1988). La fase infectiva de la especie normalmente, es la asexual o anamorfo, en la cual, el hongo forma macroconidias, microconidias y clamidosporas. Esta última estructura le confiere alta resistencia frente a condiciones adversas y le permite al hongo permanecer por varios años en estado de latencia.

Las macroconidias son células pluricelulares, grandes, en forma de huso. Presentan septos transversales y paredes que pueden ser tanto finas como gruesas y lisas o rugosas, mientras las microconidias, pequeñas como lo dice su nombre, son de forma redonda, ovalada y piriforme, pueden ser unicelulares y pluricelulares. Las clamidosporas se desarrollan dentro de la células vegetativas ante condiciones adversas (Sosa, 2011).

En cultivos de tomate y otras hortalizas, se reconoce el ataque de *Fusarium* por presentar el síntoma de marchitez que produce este patógeno que inicia su infección en las raíces, penetra principalmente a través de heridas y aberturas naturales como las ocasionadas con la salida de nuevas raíces. La interacción planta-patógeno en el suelo está mediada por la comunicación molecular establecida a través de la liberación de componentes solubles o volátiles de las semillas y/o exudados de las raíces que activan la germinación de los propágulos fungosos (Sánchez de P., 2007).

La mayoría de las sustancias producidas por las raíces de las plantas, como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, flavonoides, enzimas, ácidos grasos, reguladores de crecimiento, nucleótidos, taninos, hidratos de carbono, esteroides, terpenoides, alcaloides, poliacetilenos y vitaminas, hacen parte de los procesos metabólicos de la planta (Barnet *et al.*, 1972; Chehri 2011, pero sólo en los últimos años, con los estudios de proteómica se ha empezado a comprender acerca de las moléculas específicas exudadas para iniciar el crecimiento vegetativo de los propágulos de hongos en la rizósfera (Chehri, 2011).

### **2.2.1 Métodos de control de *Fusarium spp.***

Dentro de los métodos de control implementados en la agricultura convencional, se ha acudido a la fumigación del suelo, con resultados iniciales positivos, pero la recolonización de éste ocurre muy rápidamente. El agricultor en su intento por hacer frente a este patógeno tan agresivo, acude en muchas ocasiones a aplicar mezclas de fungicidas con diferente grado toxicológico, lo cual acelera los procesos de resistencia del patógeno y torna su control más difícil (Pera y Calvet 1989; Garibaldi, 1988; Sosa *et al.*, 2011).

Dentro de las prácticas alternativas se ha acudido al manejo del pH del suelo (6-7), disminución de los niveles de nitrógeno y control biológico, basado en la utilización de hongos antagonistas pertenecientes al género *Trichoderma* (Cotes, Cardenas y Pinzon., 2001) y de bacterias, promotoras del crecimiento – PGPR - (Kloepper y Gaugler, 2004). Estos antagonistas han demostrado habilidad para inducir resistencia en la planta y reducir la presencia y expresión de la enfermedad.

Varios metabolitos secundarios como xenocumacinas y xenorhabdinas, entre otros procedentes de *X. bovienii* se han registrado como activos sobre un amplio espectro de patógenos de plantas, incluido *Fusarium spp.*, (Wang, 2011). De ahí la necesidad de validar esta información con miras a profundizar sobre esta alternativa promisorio de control biológico amigable con el ambiente, los agroecosistemas y la salud humana y animal.

Oyervides (1999), plantea el uso de cultivares resistentes como el método de control ideal por economía, seguridad, no lleva a contaminación del ambiente ni del suelo y es confiable. En tomate y en particular para esta enfermedad, las variedades resistentes se han planteado como el método más satisfactorio (Blancard, 1997, Botanical on line, 2011), de ahí que una de las prioridades sea encontrar este tipo de materiales vegetales. También se ha utilizado la rotación de cultivos, la cual no es completamente efectiva debido a que las clamidosporas de *Fusarium* sobreviven mucho tiempo en el suelo (Sosa *et al.*, 2011).

### **3. HIPOTESIS**

#### **3.1 HIPÓTESIS GENERAL**

Algunos metabolitos secundarios de la bacteria *X. bovienii* (Enterobacteriaceae), simbionte del nematodo entomoparasito *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) (Cephalobina: Steinernematidae) cepa Colombia, presentarán actividad antibiótica sobre el hongo fitopatógeno *Fusarium* spp, habitante de suelo y rizósfera, limitante para el cultivo de tomate.

#### **3.2 HIPÓTESIS ESPECÍFICAS**

Algunos metabolitos secundarios de la bacteria *X. bovienii* (Enterobacteriaceae), simbionte del nematodo entomoparásito *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) (Cephalobina: Steinernematidae) cepa Colombia, extraídos en diferentes etapas del crecimiento del cultivo bacteriano presentarán actividad antibiótica sobre el hongo fitopatogeno *Fusarium* spp aislado de la rizosfera de tomate.

Algunos metabolitos secundarios obtenidos en diferentes etapas de crecimiento de *X. bovienii* que presenten actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* también afectarán al hongo fitopatógeno *Fusarium* spp.

Los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana de la bacteria *X. bovienii*, no presentarán actividad fitotóxica en semillas ni plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) variedad Santa Clara.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana de algunos metabolitos secundarios de la bacteria *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae), simbiote del nematodo entomoparásito *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) (Cephalobina: Steinernematidae) cepa Colombia, sobre aislados de *Fusarium* spp, habitante de suelo y rizósfera, limitante para el cultivo de tomate.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener en cultivo puro los microorganismos objeto de este estudio: *Fusarium* spp, *Xenorhabdus bovienii* y *Bacillus subtilis*
- Reconocer la cinética de crecimiento de *X. bovienii* y obtener algunos de sus metabolitos secundarios por diferentes métodos de extracción.
- Comprobar si hay actividad antibiótica de los metabolitos secundarios obtenidos de *X. bovienii* sobre *Bacillus subtilis* y *Fusarium* spp.
- Evaluar si los metabolitos obtenidos de *X. bovienii* tienen actividad fitotóxica sobre tomate *Solanum lycopersicum* L. variedad Santa Clara.



## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 OBTENCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS OBJETO DE LA INVESTIGACIÓN

#### 5.1.1 Aislamientos de hongos rizósfericos en la búsqueda de *Fusarium* spp con capacidad patogénica en tomate.

Para las primeras búsquedas, en el 2008, se hicieron dos recorridos de campo en municipios del Valle del Cauca (Roldanillo, La Unión y Toro) donde se cultivaba tomate en forma intensiva sin descanso del suelo ni rotación de cultivos. Allí, se encontró que se había dejado de sembrar en la mayoría de las áreas, debido a severos problemas fitosanitarios causados por protistas como *Phytophthora* sp y hongos como *Rhizoctonia* sp y *Fusarium* spp, los cuales no se lograron controlar por los métodos convencionales (control químico), aunado a factores climáticos, exceso de lluvias, principalmente. Esto había convertido al cultivo de tomate insostenible económicamente en la zona.

Fue necesario cambiar los sitios de muestreo en el Valle del Cauca y Cauca, se encontraron cultivos de tomate (T) en Santa Elena (SE), Guacarí (Gu), Media Canoa (MC), El Bolo (B), Puerto Tejada (PT) y Toro (T) – Figura 1 - donde se buscaron plantas con síntomas característicos de ataque de *Fusarium* en este cultivo. La descripción de algunos de estos síntomas son: amarillamiento en las hojas basales que posteriormente se marchitan, se secan pero permanecen adheridas a la planta. La sintomatología va progresando hacia la parte superior de la planta. Al comienzo las plantas muestran marchitez hasta llegar a la muerte, la base del tallo presenta necrosis vascular. Cuando se corta el tallo se observa el sistema vascular de color marrón (García 2008).

Para la recolección de muestras de tejido de plantas y suelo, se recorrieron los lotes en zig-zag y, se colectaron 500 g de suelo (de 0 a 20 cm de profundidad) y rizósfera en los sitios circundantes a posibles plantas afectadas por *Fusarium* spp (Figura 2). Se recogió, además, material vegetal con algunos de los síntomas descritos anteriormente.



**Figura 1.** Municipios del Valle del Cauca donde se tomaron muestras de plantas de tomate con posibles síntomas de ataque de *Fusarium* spp (indicados con cuadrados claros)

Las muestras se colocaron en bolsas plásticas, marcadas, depositadas en neveras de icopor y trasladadas al laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, donde se adelantaron las labores de aislamiento e identificación de los hongos.

Para los aislamientos se acudió a dos técnicas: a partir de muestras de tejido de raíz y mediante el método de diluciones en serie del suelo rizosférico (Anexo A).

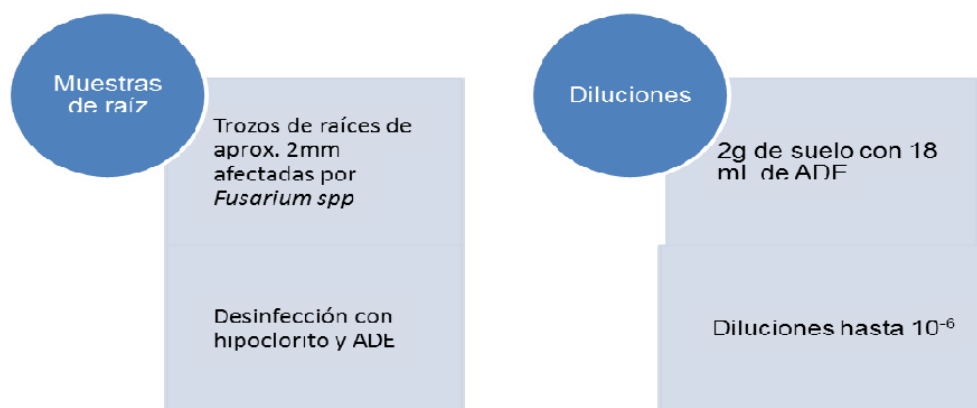


**Figura 2.** Planta de tomate con posibles síntomas de ataque de *Fusarium* spp. a nivel de tejido vascular.

- **A partir de muestras de raíz:** Se seleccionaron las raíces de acuerdo con los posibles síntomas característicos de la enfermedad, se cortaron partes de ellas cuidando que fuesen tejidos recién afectados. En el laboratorio, se cortaron trozos de 2 mm, los cuales se desinfestaron con alcohol al 95% por espacio de un minuto, se sumergieron en hipoclorito de sodio (0.5%), entre dos y cinco minutos y los excesos se removieron con agua destilada por dos a cinco minutos (Bueno, Patrignanil, Feldman y García 2008).

El material vegetal previamente desinfestado, se sembró en cajas de Petri que contenían papa dextrosa agar (PDA) con ácido láctico al 25%, como inhibidor de crecimiento de bacterias. Las cajas de Petri se incubaron a 28°C durante 48 y 72 horas para observar las primeras señales de crecimiento fungoso y proceder a la selección y reaislamiento de las colonias correspondientes al hongo *Fusarium* spp.

- **A partir de diluciones seriadas:** Para esto, 2 g de suelo fueron depositados en un tubo de ensayo con 18 ml de agua destilada estéril ADE (llamada solución 1 o madre). Aparte se llenaron otros 6 tubos con 18 ml de ADE y, se adicionó 1 ml de la solución 1 o madre ( $10^{-2}$ ). De este, 1 ml al tercer tubo ( $10^{-3}$ ), así sucesivamente hasta obtener la última solución  $10^{-6}$  (Anexo 1). A fin de obtener una menor concentración del hongo obtenido, que permitiera contar y diferenciar las estructuras allí presentes.



**Figura 3.** Métodos de aislamiento de hongos fitopatógenos presentes en la rizósfera

Las colonias fueron identificadas con ayuda de claves morfológicas de Barnett y Hunter (1972); Pardo-Cardona (1995) y participación y colaboración de especialistas, profesores del área de Fitopatología de la Universidad Nacional de Colombia sedes Bogotá y Palmira. La presencia de hongos asociados al cultivo del tomate se caracterizó por apreciación visual como alta, media, poca y escasa, según se detectaran en todas los muestreos y formando abundantes colonias (alta), hasta aquellos que solamente aparecían raramente en algunos muestreos (escasos).

Con los aislamientos de hongos identificados como posibles fitopatógenos y correspondientes a *Fusarium*, se obtuvieron cultivos puros en PDA inclinado y conservados en condiciones controladas de incubadora a 28 °C.

#### **5.1.1.1 Pruebas para establecer patogenicidad de aislamientos de *Fusarium* spp.**

Estas pruebas se llevaron a cabo, a fin de demostrar que los aislados de *Fusarium* obtenidos a partir de muestras en campo, causaban la sintomatología inducida por este hongo en el cultivo de tomate. Esta fase del trabajo se contó con la participación y colaboración de la estudiante de Pregrado en Ingeniería Agronómica Sharon Davey Clavijo (2008), quien realizaba en la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, su trabajo de investigación sobre *Fusarium* spp.

Dichas pruebas se efectuaron siguiendo el presente protocolo:

- **Obtención del Inóculo:** La suspensión se obtuvo, adicionando 20 ml de agua destilada estéril a las cajas de Petri con los cultivos puros de *Fusarium* spp. previamente identificados y sembrados en PDA ocho (8) días antes. Los cultivos se filtraron, en una capa doble de gasa estéril. Se ajustaron las concentraciones de inóculo a  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  conidios/ml (Escalona *et al.*, 2006).
- **Evaluación de patogenicidad sobre semillas:** La patogenicidad se evaluó sobre semillas de tomate variedad Santa Clara (Seminis®), comercializadas por Semillas Arroyave S. A., Trujillo Valle del Cauca.

Las semillas se desinfectaron superficialmente con alcohol al 70% por 15 minutos y agua destilada estéril (ADE) por 30 minutos. Para la inoculación se utilizaron los posibles aislamientos patogénicos de *Fusarium* sumergiendo la semilla en una suspensión concentrada del inóculo por espacio de 12 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se distribuyeron en cajas de Petri estériles, sobre papel absorbente estéril, previamente humedecido.

La evaluación de patogenicidad se realizó usando la escala propuesta por Duarte, 2007, en la cual, al cuarto día de incubación se determinó la severidad del daño causado por *Fusarium* spp. en cada semilla. El índice de severidad se estimó de acuerdo a la siguiente escala de valores:

**Tabla 1.** Índice de severidad de *Fusarium* spp en semillas de tomate variedad Santa Clara (Duarte, 2007)

Escala de valor	Descripción de sintomatología
0	Semilla Sana
1	Daño de una parte de la semilla en contacto con el micelio
2	Tegumento de la semilla invadido por micelio y esclerocios, pero la plántula está sana
3	Tegumento de la semilla libre del hongo, pero plántula infectada
4	Tegumento de la semilla y plántula infectada
5	Semilla infectada y no germinada

#### 5.1.2 Aislamiento de la Bacteria *Xenorhabdus bovienii*:

La bacteria se obtuvo a partir de la hemolinfa de larvas de *Galleria mellonella* mantenidas en condiciones controladas de laboratorio sobre dieta artificial, las cuales se infectaron con *Steinernema feltiae* al alcanzar el IV o V instar, según la metodología descrita por Akhurst y Boemare (1990) y Triviño, parada y Luque,

(2006). Para ello, larvas de *G. mellonella*, se colocaron en cajas de Petri con papel filtro humedecido o arena también húmeda, donde se han depositado juveniles infectivos del nematodo que penetran a dichas larvas por la aperturas naturales, boca y/o ano. Ya establecido el nematodo en la hemolinfa del insecto libera la bacteria simbiote, quien provoca la muerte de la larva.

Pasados 5 – 7 días, se tomaron las larvas muertas que presentaban coloración amarillosa (Figura 4) y se les introdujo por el ano o la cavidad bucal una jeringa Hamilton de 10  $\mu$ L (Figura 5), a través de la cual se tomó la muestra de hemolinfa en la que está presente la bacteria (Triviño, Parada y Luque 2006; Martínez, 2009).



Foto: Parada, 2006

**Figura 4.** Larvas de *G. mellonella*, infectadas con *S. feltiae*.



Foto: Parada, 2006

**Figura 5.** Toma de la muestra de hemolinfa.

De esta primera muestra se tomó 1 ml para realizar diluciones seriadas ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ) y sembrar en cajas de Petri con agar nutritivo (AN), a razón de 100  $\mu$ l por placa y realizando 3 repeticiones por cada dilución.

La bacteria fue transferida a medio NBTA (Agar Nutritivo + 0.0025% azul de Bromotimol +0.004% de Cloruro de Trifeniltetrazoliolo) y en Agar McConkey (Woodring y Kaya, 1988), que permitió reconocer las dos fases de crecimiento FI y FII que la caracterizan (Triviño, Parada y Luque, 2006).

Las siembras de la bacteria se rotularon y colocaron en incubadora a 28°C por espacio de 24 a 42 horas, rango en el cual se realizó el conteo de unidades formadoras de colonia (ufc) y dichos resultados se graficaron con el propósito reconocer el crecimiento de la bacteria y sus posibles tiempos de producción de metabolitos secundarios con capacidad antibiótica (Martínez J., 2010). Los aislamientos de la bacteria fueron conservados en condiciones artificiales de medio de cultivo NBA a 4 °C-

### **5.1.3 Obtención y mantenimiento de *Bacillus subtilis* como control para pruebas de antibiosis**

Esta bacteria se utilizó como organismo indicador en las pruebas con los metabolitos secundarios extraídos. Según la literatura es el microorganismo utilizado ya que es muy susceptible a los antibióticos producidos por *Xenorhabdus* spp (Isaacson, 2000; Chen, Dunphy y Webster 1994; Maxwell *et al.*, 1994). El aislamiento fue donado por el laboratorio de Microbiología de Suelos del Departamento de Biología de la Universidad Nacional Sede Bogotá, previamente

identificada como cepa C4 (nombre de la cepa, dado según el orden llevado en el laboratorio). Es una bacteria Gram positiva, de vida libre, con capacidad para solubilizar fosfatos, produce endosporas que son termorresistentes y resiste condiciones como desecación y radiación, vive dentro de los límites de 55 a 70°C.(Cuervo, 2010).

La colonia se conservó, reactivó y se mantuvo sembrada en cajas de Petri con medio de cultivo Agar Nutritivo (AN). Se trasladó al laboratorio de Malherbología de la Facultad de Agronomía, lugar en el cual se llevó a cabo el proceso de obtención de metabolitos. La bacteria, se mantuvo refrigerada a 4°C, mientras se utilizaba como organismo indicador para pruebas con los metabolitos obtenidos de *X. bovienii*.

## **5.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y EXTRACCIÓN DE METABOLITOS DE *X. bovienii*.**

Para cumplir con el objetivo 2, se desarrollaron tres etapas: en la primera se caracterizó la cinética de crecimiento de la bacteria en condiciones de reactor; en la segunda, se determinaron tiempos de crecimiento en los cuales era exitoso la extracción de metabolitos secundarios, y, en la tercera, se seleccionaron las metodologías a emplear para la extracción de tales metabolitos.

**5.2.1. Cinética de crecimiento:** La cinética de crecimiento de *Xenorhabdus bovienii* se evaluó en condiciones de reactor, en los medios líquidos más frecuentemente usados en investigación de relación bacteria-nematodo (Ehlers, 2001), trabajo estandarizado por Parada, Luque y Piedrahita (2006) y Martínez (2010) como parte del macroproyecto de investigación “Escalado y Formulación Industrial de *Steinernema feltiae* (Cephalobina: Steinernematidae) Cepa Colombiana y su bacteria Simbionte *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae) para el control de insectos y fitopatógenos” financiado parcialmente por Colciencias y coordinado por Sánchez de P., Parada y Jiménez, (2010).



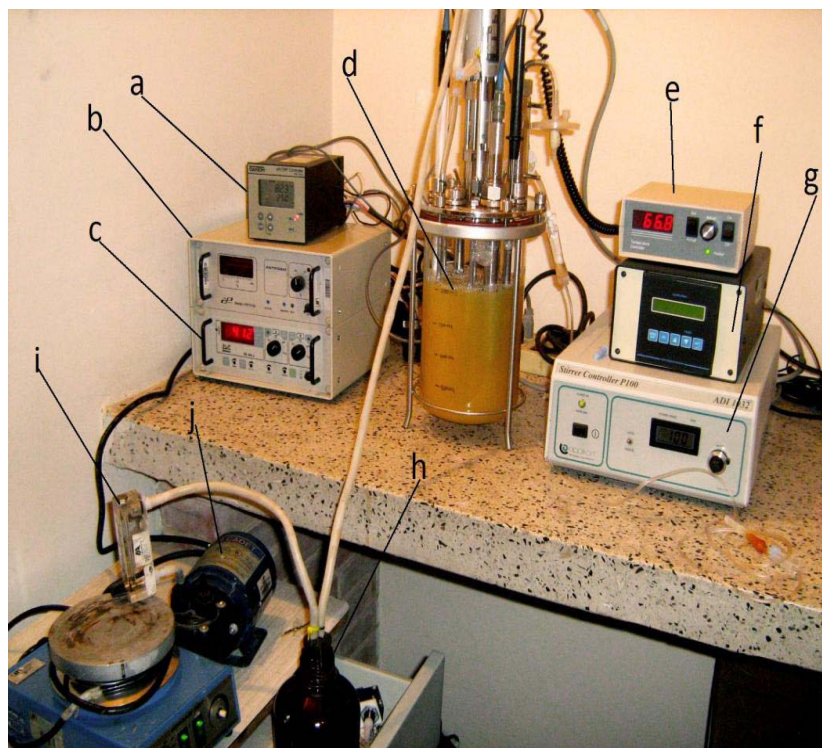


Foto: Martínez, 2010

**Figura 6.** Biofermentador utilizado en el seguimiento de la cinética de crecimiento de *X.bovienii*

La cinética de crecimiento de *X. bovienii*, se analizó a través del cálculo del tiempo generacional, expresado como  $k = \frac{\log_{10} N_t - \log_{10} N_0}{0.301 \cdot t}$  donde  $N_0$ = número de células el inicio;  $N_t$ = número de células a final y  $t$ = tiempo desde  $N_0$  a  $N_t$ , expresado en horas; tiempo de duplicación, expresado como  $t_d = 1/k$ ; (Sánchez de P, Párrada y Jiménez, 2010)

De acuerdo con esta curva de crecimiento, que se discutirá en resultados, se tomó la decisión para la obtención de metabolitos secundarios, respecto a la intensidad y horas de muestreo, evaluando desde la fase de crecimiento exponencial y estacionaria hasta llegar a la hora 96, como se describirá más adelante, tiempo en el cual, se esperaba la producción de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas ya que allí, las células producen proteasas, fosfolipasas y es en estas fases donde se ha registrado la producción de metabolitos secundarios con efecto antibiótico (Xu 1998, Triviño, Parada y Luque 2006; Martínez, 2010).

**5.2.2. Extracción de Metabolitos Secundarios de *X. bovienii*:** Los cultivos puros de la bacteria *X. bovienii* cultivada en NBTA se habían almacenado en nevera a 4 °C, hasta el momento de obtener los metabolitos secundarios. Para esto, se preparó un sustrato compuesto por: glucosa 6,13 g/L, peptona 21,29 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1,5 g/L,  $(NH_4)_2SO_4$  2,46 g/L,  $KH_2PO_4$  0,86 g/L,  $K_2HPO_4$  1,11 g/L, y  $Na_2SO_4$  1,72 g/L que actúan como nutrientes, fuentes de carbono y nitrógeno.

La siembra de la bacteria se realizó tomando 150 ml de este medio en 12 erlenmeyers de 250 ml. Dichos erlenmeyers se sometieron a esterilización en autoclave a 121°C y 15 lb/pulg<sup>2</sup> por espacio de 15 minutos. Posteriormente a cada uno de ellos se adicionó 7,5 ml de inóculo (5% del volumen del medio). Estos recipientes con inóculo, se pasaron a un fermentador orbital durante 7 días a 25°C en oscuridad manteniendo agitación constante de 1000 rpm.

Se tomaron 300 ml de la siembra efectuada (se requería el volumen depositado en 2 erlenmeyers) y se consideró como hora cero (0) el momento de inicio de agitación en el fermentador. Se realizaron mediciones de 300 ml a las horas 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 56, 64, 72, 80, 88 y 96 h, correspondientes a 18 muestreos destinados a estimar el tiempo de producción de compuestos con actividad biológica y, proceder a la extracción de metabolitos secundarios. Los montajes, se realizaron de forma escalonada para lograr cubrir todas las horas de muestreo necesarias, ya que los equipos no eran suficientes para realizar un solo montaje.

#### **5.2.2.1 Métodos utilizados para la extracción de metabolitos secundarios de *X. bovienii*.**

- **Extracción de Metabolitos Secundarios Orgánicos** (Xu, 1998; Vela *et al*, 2009a).
  - i. Tras centrifugar 300 ml (2 erlenmeyers), de los cultivos bacterianos, tomados a las horas referidas, durante 15 minutos a 9000 rpm, el sobrenadante se pasó por papel filtro poro 0,2 µm para obtener el filtrado libre de células.
  - ii. Se adicionaron 25 ml de acetato de etilo al sobrenadante y se recogió la fase orgánica, se repitió la extracción 3 veces y de esa forma se recuperó la mayor cantidad posible de los compuestos orgánicos producidos. De aquí, se guardó la fase acuosa para la posterior extracción de proteínas.
  - iii. La fase orgánica se secó con 5 g de sulfato de sodio anhidro por media hora para eliminar agua presente.
  - iv. Se realizó filtración al vacío de la fase orgánica para separar sulfato de sodio y evaporar el filtrado en rotavapor a 30°C para eliminar el acetato de etilo y obtener solamente los compuestos de interés (solución café).
  - v. Posteriormente se re-disolvió el residuo obtenido en 5 ml de etanol y se conservó refrigerado a 4 °C para las pruebas de actividad biológica.



Foto Leguizamo, 2009

**Figura 7.** Rotavapor utilizado en las labores de extracción de Metabolitos Secundarios

▪ **Extracción de Proteínas** (Xu, 1998, Vela *et al.*, 2009a)

- i. Se tomó la fase acuosa obtenida en la metodología anterior, a la cual se adicionó sulfato 50 g de sulfato de amonio pulverizado agitando lentamente hasta llegar al 80% de saturación, de acuerdo con la metodología implementada.
- ii. Se dejó reposar por 20 minutos sobre hielo y luego se centrifugó la solución a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C, paso que se realiza con el fin de concentrar los metabolitos por cambios de temperatura.
- iii. Se re-disolvió el liofilizado en 5 ml de buffer fosfato (pH 6-7) y se conservó refrigerado a 4°C, para pruebas de actividad biológica.

Por esta metodología Cabral *et al.*, 2004 han registrado obtención de metabolitos con actividad antibiótica.

▪ **Compuestos de Indol** (Xu 1998; Vela *et al.*, 2009a): Tras centrifugar 300 ml (2 erlenmeyers) de la muestra tomada a las horas referidas, durante 15 minutos a 10000 rpm a 4°C se obtuvo la solución libre de células, la cual correspondió al sobrenadante, se pasó por papel filtro poro 0,2  $\mu\text{m}$  para obtener el filtrado libre de células. Este método se considera eficiente, ya que Li, Hu y Webster, 1998 lo han registrado como método para la obtención de los metabolitos xenorhabdinas con actividad antibiótica.

▪ **Metanol** (Webster y Chen 1998; Vela *et al.*, 2009a): A 300 ml del sobrenadante libre de células se adicionaron 150 ml de acetato de etilo para recuperar la mayor cantidad posible de los compuestos orgánicos, ya que son solubles en este solvente. Se separaron las fases y se recogió la fase orgánica (arriba), mientras

que la fase acuosa (abajo) se extrajo 2 veces más con 100 ml metanol, recogiendo la fase orgánica de la que se eliminó el agua remanente con sulfato de sodio luego, el sulfato de sodio fue separado por filtración al vacío y el acetato de etilo se secó en rotavapor obteniendo así aproximadamente 1 ml de residuo aceitoso de color café-amarilloso. Este último, se reconoció como extracto de interés ya que Webster y Chen (1998); Wang *et al.*, (2008); Vela (2009), han registrado que utilizando esta metodología, es posible la obtención de xenocumacinas, metabolito que también tiene función antibiótica.

▪ **Paso a través de Columna para Cromatografía** (Webster y Chen, 1998; Vela *et al*, 2009a): La muestra obtenida después del paso por el rotavapor (con el objetivo de eliminar excesos de agua) fue sometida a columna para cromatografía Amberlite XAD que permite separar los compuestos orgánicos de las sales y azúcares usados en el medio de cultivo así como las proteínas producidas (Figura 8).

Está registrado por Webster, Li, y Chen (1998) que este método permite obtener xenocumacinas, uno de los compuestos producidos por la bacteria reconocido por su actividad antibiótica, los cuales no se pueden extraer con el método de metanol (Torrenegra y Baquero, 2005).



Foto Leguizamo, 2010

**Figura 8.** Columna para cromatografía.

Para esto, la muestra se dispuso en la columna y se lavó con agua destilada en una relación 1 L de agua por 20 ml de solución, el residuo obtenido al principio fue de color café-amarillo, y, una vez se observaba el agua traslúcida, se procedió a adicionar entre 80 y 100 ml de metanol, el cual se encargó de lavar los compuestos antibióticos que han sido retenidos por la columna. El líquido obtenido metanol/extracto se recogió presentando de nuevo un color amarillo.

Con el fin de eliminar de nuevo el exceso de agua que pudo haber quedado en la columna y el metanol adicionado, la muestra se volvió a llevar al rotavapor y la solución obtenida finalmente se almacenó en frascos ámbar debido a que los compuestos recuperados se han registrado como fotosensibles. La muestra se guardó en el refrigerador a 4°C para ser utilizada en las pruebas de antibiosis.

▪ **Extracción con Butanol:** En esta última metodología de extracción se usó butanol (Cabral *et al.*, 2004). Las muestras recogidas después de su paso por el rotavapor se llevaron a un embudo de decantación, donde se adicionó el doble de butanol (relación 1ml muestra/2 ml butanol), se agitó suavemente para evitar la formación de espuma y se dejó decantar hasta cuando se evidenciaron dos fases, el sobrenadante se recogió ya que es la parte útil, y el decantado (parte de abajo oscura) se volvió a incluir en el embudo, adicionando de nuevo butanol y repitiendo el proceso tres veces.

Las muestras recogidas se unieron por hora de muestreo y se pasaron de nuevo por rotavapor, se almacenaron y de igual forma que en el método anterior se refrigeraron en frascos ámbar, para evitar la exposición a la luz, para ser utilizadas en las pruebas de antibiosis.

Para todos los métodos, la muestra original se tomó como concentración 100%, y se disolvió en metanol a 75%, 50% y 25% de concentración para realizar las pruebas antimicrobianas y comprobar el efecto de la concentración de los metabolitos sobre su acción inhibitoria con *Bacillus subtilis* y aislamientos de *Fusarium* spp.

### **5.3 RECONOCIMIENTO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE *X. bovienii*, OBTENIDOS CON DISTINTAS METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN**

#### **5.3.1 Sobre *B. subtilis***

Esta bacteria cepa C4, se utilizó como organismo Indicador, por su susceptibilidad a los metabolitos secundarios obtenidos de *X. bovienii*, la cual como se dijo anteriormente, se obtuvo del Laboratorio de microbiología de suelos

del departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

Para realizar las pruebas de antibiosis, la bacteria se sembró en cajas de Petri con Agar Nutritivo (AN) e incubó a 27°C. Transcurridas 24 horas de inoculada, se dispusieron radialmente sensidiscos de papel filtro Whatman 51, de 0.5 cm impregnados con las soluciones de metabolitos secundarios obtenidos a partir de los diferentes métodos de separación y, de las diferentes horas de muestreo. Se tomaron los metabolitos después del paso por el rotavapor, ensayando la muestra concentrada (100%) y las diluciones en metanol al 75%, 50% y 25%. Como testigo se utilizó un sensidisco impregnado con ADE ubicado en la mitad de la caja de Petri. Seguido a esto, las cajas se incubaron a 27°C, con tres repeticiones por muestra de metabolito obtenida.

El experimento se ajustó a un diseño completamente al azar (DCA), con arreglo factorial de las fuentes de variación: 6 metodologías de extracción de metabolitos secundarios de *X. bovienii* x 18 tiempos de muestreo x 4 concentraciones (100, 75, 50 y 25%), para un total de 432 tratamientos, con 3 repeticiones/tratamiento.

La variable evaluada correspondió a diámetro del halo de inhibición bacteriano medido en centímetros (cm). Los resultados se sometieron a análisis de varianza mediante el uso del programa estadístico SAS ® 9.2. Cuando se detectaron diferencias significativas, los resultados se sometieron a la prueba de Duncan.

### **5.3.2. Sobre aislamientos de *Fusarium* spp.**

Las mismas pruebas que se adelantaron sobre la bacteria *B. subtilis*, se realizaron sobre los seis aislados del hongo *Fusarium* spp., previamente seleccionados como resultado de las pruebas de patogenicidad, nombrados como: SETMF1M6, SETMF1M4, GuM1R2, GuM5R1, GuM6R1, y Btu2, los cuales se mantuvieron en PDA (Lara, 2010).

Así, una muestra de micelio de cada aislamiento seleccionado, que había crecido inicialmente en PDA, se tomó con un asa, y se dispuso en el centro de cajas de Petri con PDA. Estos montajes se llevaron a incubadora a 27°C. Transcurridos cuatro días (4) de crecimiento de los aislamientos, se verificaba que el hongo se hubiese desarrollado e independiente del diámetro de crecimiento alcanzado, se colocaron sensidiscos alrededor del micelio con las soluciones de metabolitos obtenidas en las diferentes horas de muestreo. Dos sensidiscos impregnados con ADE se utilizaron como testigos.

Todas las unidades experimentales se llevaron a incubadora, en condiciones de oscuridad, con temperaturas de 28°C. Después de 5 días se evaluó el crecimiento de cada uno de los seis aislamientos fungosos y la posible formación de halos de inhibición, previa comparación con los testigos.

El experimento se ajustó a un diseño completamente al azar (DCA), con arreglo factorial de las fuentes de variación: 6 metodologías de extracción de metabolitos secundarios de *X. bovienii* x 18 tiempos de muestreo x 4 concentraciones x 6 aislamientos de *Fusarium* spp para un total de 2592 tratamientos, con 3 repeticiones/tratamiento. La variable evaluada correspondió a diámetro del halo de inhibición de los aislados del hongo, medido en centímetros (cm). Los resultados se sometieron a análisis de varianza mediante el uso del programa estadístico SAS ® 9.2. Cuando se detectaron diferencias significativas, se utilizó la prueba de Duncan.

#### **5.3.2.1 Cambios en la esporulación y formación de clamidosporas de los seis aislamientos de *Fusarium* spp.**

Dada la necesidad de validar si había cambios en los caracteres morfológicos de estos seis aislamientos, que pudiesen ser ocasionados por los metabolitos secundarios a los cuales se enfrentaron, se buscaron medios de cultivo pobres en nutrientes que favorecieran la expresión de estructuras de resistencia como las clamidosporas y también, macro y microconidias. Se tuvo como fuentes de variación: 5 métodos de extracción de metabolitos x 18 tiempos evaluados x seis aislamientos y una máxima concentración de metabolitos (100%). El ensayo se ajustó a un diseño completamente al azar (DCA) y los resultados se sometieron a ANDEVA y prueba múltiple Duncan. (Leslie and Summerell, 2006).

Los dos medios seleccionados fueron:

- **CLA: Carnation Leaf-piece Agar:** Este medio consiste en agar-agar con trozos de hojas de clavel desinfectados introduciéndolos durante 5 min en ADE con unas gotas de hipoclorito 4%, no es un medio con fuentes de carbohidratos y, de esta forma, genera condiciones de estrés que permiten reconocer las características colonia, las tasas de crecimiento, formas y tamaños, ya que obliga al hongo a la producción de macroconidias, microconidias, y clamidosporas, las cuales presentan crecimiento más uniformes en tamaño y forma, que aquellas que se pueden desarrollar en PDA (Comerio, Pildan y Romero, 2005).

**SNA: Spezieller Nährstoffarmer Agar:** Favorece la presencia y formación de microconidias, que difieren morfológicamente de aquellas que se pueden producir en CLA, las clamidosporas pueden ser más evidentes en este medio, tiene la ventaja de ser transparente lo cual facilita la observación al microscopio (Troya *et al.*, 1995).

#### **5.4. PRUEBAS DE FITOTOXICIDAD EN TOMATE CON LOS METABOLITOS OBTENIDOS POR LAS DIFERENTES METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN**

Estas pruebas se llevaron a cabo, a fin de determinar los posibles efectos de las soluciones de metabolitos sobre la germinación y crecimiento de plántulas de tomate variedad Santa Clara (Seminis®), material vegetal empleado en todo el experimento.

Los ensayos se adelantaron directamente en suelo, tomado del invernadero de la Facultad de Agronomía correspondiente a material traído de la sabana de Bogotá, Municipio de Cota del primer horizonte 0-18 cm, clasificado taxonómicamente como *Typic Hapludands*. En este caso no se tuvo en cuenta el tipo de suelo de donde procedían los aislamientos de *Fusarium* spp, sino unas condiciones específicas que permitieran expresar o no la fitotoxicidad de los metabolitos obtenidos. El suelo utilizado se caracterizó por presentar color oscuro, pH 6.5, densidad aparente cercana a 0.7 g/cc y alta presencia de cenizas volcánicas, que se expresa en su grupo taxonómico (USDA, 2010)

Se recogieron aproximadamente 4 Kg, los cuales fueron llevados al laboratorio de Malherbología de la Facultad de Agronomía, U.N. Bogotá, se depositaron en bolsas plásticas, se sometieron a esterilización en autoclave, con el fin de evitar la presencia y proliferación de organismos contaminantes habitantes del suelo.

El suelo se dejó enfriar dentro de las bolsas aproximadamente 12 horas, pasadas tras las cuales aproximadamente 210g se depositaron en vasos plásticos desechables de 7 onzas. Las semillas para hacer esta prueba se depositaron en un vaso de precipitado con ADE, durante 24 horas con el objetivo de inducir la germinación, y al observar la presencia de la radícula, se procedió a realizar el montaje de las pruebas. Para esto, se tomaron cajas de Petri y se vació la solución de metabolitos obtenida en cada una de las horas de muestreo acordado y, a sus respectivas diluciones 100, 75, 50, 25%. Como fuentes de variación se tuvo: 5 metodologías de extracción de metabolitos x 18 tiempos de extracción x 4 concentraciones, para un total de 360 tratamientos con tres repeticiones. El ensayo se ajustó a un diseño completamente al azar (DCA).

De esta forma, las semillas de cada hora y concentración, fueron plantadas en los vasos con suelo estéril, aproximadamente a 0.5 cm de profundidad, se llevaron a una cámara de crecimiento controlado, la cual, por programación simula las condiciones ambientales de temperatura (18°C) y horas luz (10 horas). Este experimento se monitoreó por aproximadamente 10 días hasta que se obtuvieron plántulas de aproximadamente 10 cm de longitud. Se llevó registro de germinación, estado de las plántulas obtenidas y presencia de decoloraciones y/o manchas.



## 6. RESULTADOS

### 6.1. OBTENCIÓN DE MICROORGANISMOS OBJETO DE LA INVESTIGACIÓN

#### 6.1.1 Aislamientos de hongos rizosféricos en la búsqueda de *Fusarium* spp con capacidad patogénica en tomate

Las muestras tomadas en campo en cultivos de tomate establecidos en el Valle del Cauca permitieron que se aislaran diferentes hongos presentes en suelo y asociados a las raíces de este cultivo (Tabla 2).

**Tabla 2.** Géneros de hongos asociados a rizosfera de cultivos de tomate en el Valle del Cauca y Cauca (García *et al.*, 2008).

Géneros encontrados	Presencia	Abundancia de aislamientos en PDA
<u><i>Aspergillus</i> (diferentes colores: café, negro, amarillo)</u>	x	Alta
<u><i>Botryodiplodia</i> sp</u>	x	Escasa
<u><i>Cladosporium</i> sp.</u>	x	Poca
<u><i>Curvularia</i> sp.</u>	x	Poca
<u><i>Fusarium</i> sp</u>	x	Alta
<u><i>Levaduras</i> sp.</u>	x	Media
<u><i>Nigrospora</i> sp.</u>	x	Poca
<u><i>Penicillium</i> sp( colores verde y blanco)</u>	x	Alta
<u><i>Rhizoctonia</i> sp</u>	x	Poca
<u><i>Trichoderma</i> sp</u>	x	Alta

Fue alta la abundancia con la que se encontraron los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y el hongo objeto de esta búsqueda: *Fusarium* spp, mientras que *Botryodiplodia* sólo apareció en un mínimo número de muestras, los géneros *Cladosporium* sp, *Curvularia* sp, *Nigrospora* sp, y *Rhizoctonia* sp aparecieron en forma más frecuente y las levaduras estuvieron presentes en casi la mitad de las siembras.

Trece de estos aislamientos se identificaron como *Fusarium* spp (Tabla 3), los cuales se nominaron de conformidad con la localidad de la cual procedían, el número de muestra correspondiente (M), cultivo del cual se obtuvo Tomate (T) y la repetición en laboratorio. Esta codificación inicial aunque compleja se mantuvo durante el trabajo. Estos constituyeron los inoculantes para las pruebas de patogenicidad realizadas en semillas de tomate.

**Tabla 3.** Aislamientos de *Fusarium* spp obtenidos en los muestreos efectuados en los departamentos del Valle del Cauca y Cauca.

Aislamientos de <i>Fusarium</i> spp	Procedencia
A1	GuM1R2
A2	GuM3r
A3	GuM4
A4	GuM5R2
A5	GuM6R1
A6	MCM1
A7	BTa1
A8	BTU2
A9	BTa3
A10	PTM5R3
A11	PTM5R2
A12	SETM1M4
A13	SETMF1M6

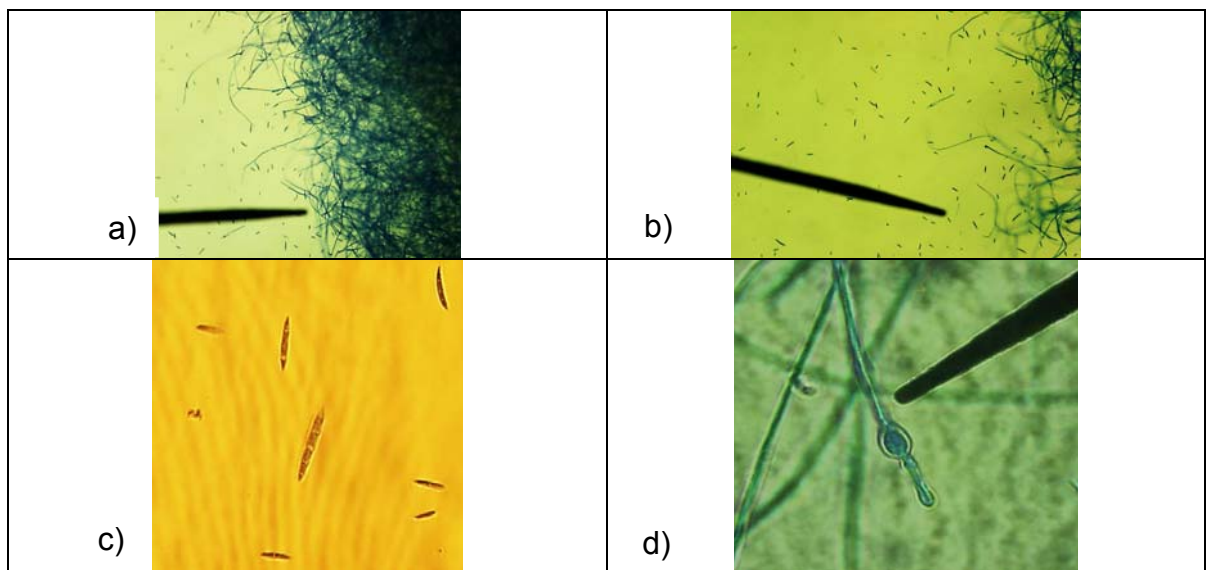
Gu=Guacarí; MC=Media Canoa; B=Bolo; PT= Puerto Tejada; SE=Santa Elena

La localidad con mayor número de aislamientos fue Guacarí (Gu), seguido por el Bolo (B). La Figura 9 detalla algunas de las características encontradas en las colonias las cuales se distinguieron por una gama de tonalidades morado, lila hasta colores claros, algunas de ellas con abundante crecimiento micelial rastrero en PDA. Se presentan también detalles de las macroconidias, microconidias y clamidosporas que caracterizan este género fungoso (Figura 10) y que fueron fundamentales para su identificación por características macro y micromorfológicas.



Fotos: Clavijo S., 2008

**Figura 9.** Gama de colores y características de crecimiento de algunas de las colonias de *Fusarium* spp sembradas en PDA



Fotos: Vergara., 2012

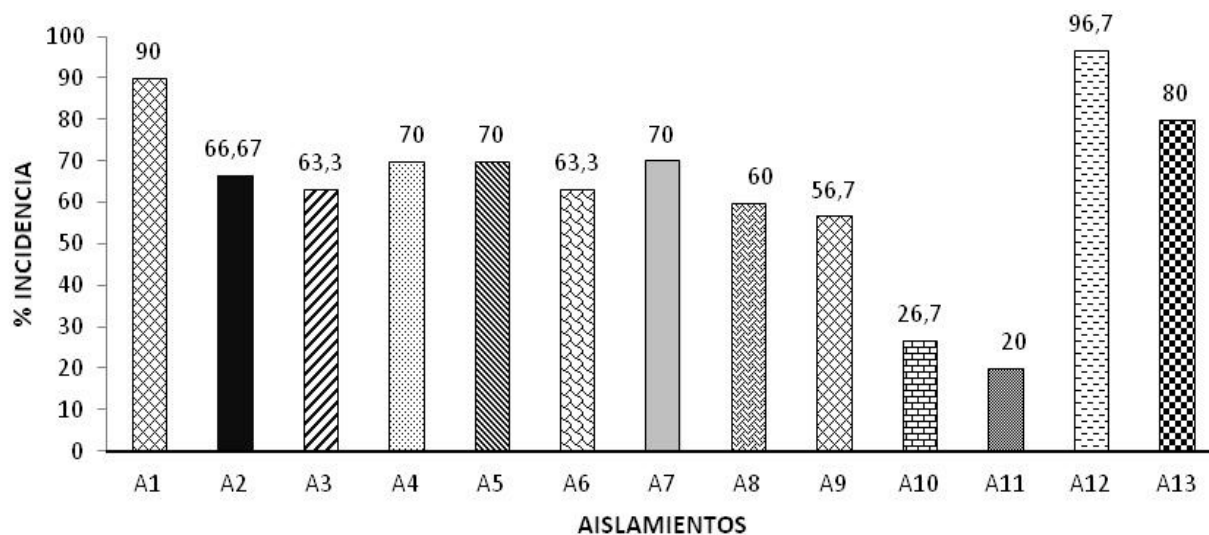
**Figura 10.** Características encontradas en las colonias de *Fusarium* spp a) Micelio (10x) b) microconidias y macroconidias (10x) c) macroconidias (40x) y d) clamidosporas (10x)

#### 6.1.1.1. Pruebas para establecer patogenicidad de aislamientos de *Fusarium* spp.

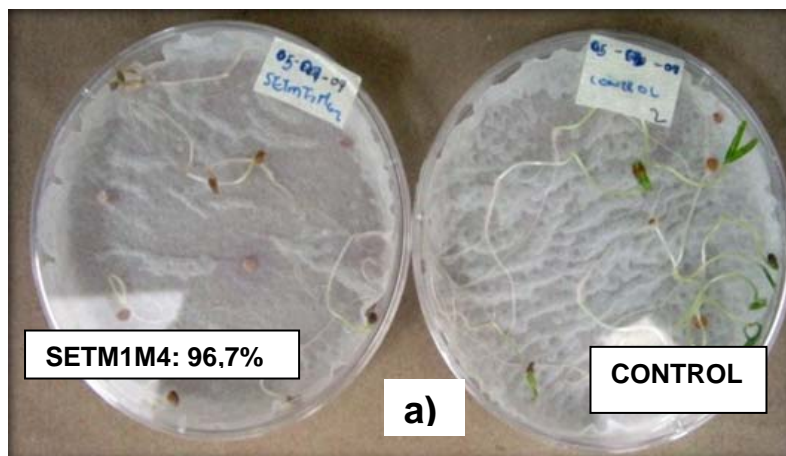
El análisis de varianza y la prueba de Duncan mostraron que los tratamientos evaluados presentaron diferencias significativas con relación al testigo (sin inóculo). De los trece (13) aislamientos de *Fusarium* spp evaluados en pruebas de patogenicidad, seis (6) mostraron actividad patogénica en semillas de tomate variedad Santa Clara (Figura 11). Los aislamientos con mayor incidencia correspondieron en orden descendente a A12 (SETM1M4), A1 (GUM1R2), A13 (SETMF1M6), A4 (GUM5R2), A5 (GUM6R1) y A7 (BTa1). Estos tres últimos no difirieron significativamente entre ellos. Los tres primeros causaron el mayor daño en las semillas de tomate, invadieron completamente la radícula y testa, que se necrosaron rápidamente. Las menores incidencias se presentaron con los aislamientos A10 (PTM5R3) y A11 (PTM5R2).

En cuanto a índice de severidad, éstos estuvieron entre 4 y 5, puesto que a pesar de la infección de las semillas por los aislamientos de *Fusarium* spp, éstas germinaron, aunque detuvieron considerablemente su crecimiento y, mientras, en las plantas control se observaba la formación de las primeras hojas, en las inoculadas sólo ocurrió en forma muy escasa (Figura 12). A pesar de que el aislamiento SETM1M4 tuvo la mayor incidencia, se observó mayor severidad con el aislamiento SETMF1M6.

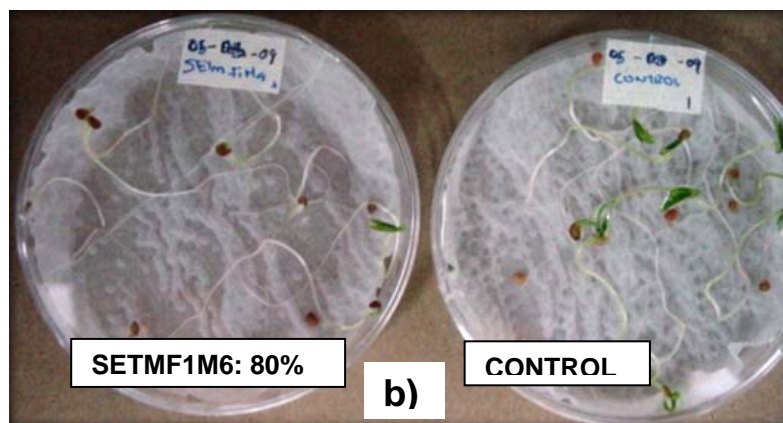
Con base en estos resultados se seleccionaron los seis aislamientos más patogénicos: A12, A1, A13, A4, A5 y A8 como representantes de *Fusarium* spp a enfrentar con los metabolitos secundarios de *X. bovienii*, descritos en las siguientes páginas.



**Figura 11.** Porcentaje de lesiones causadas por los trece aislamientos de *Fusarium* spp n pruebas de patogenicidad en semillas de tomate.



Fotos: Clavijo, 2008



Fotos: Clavijo, 2008

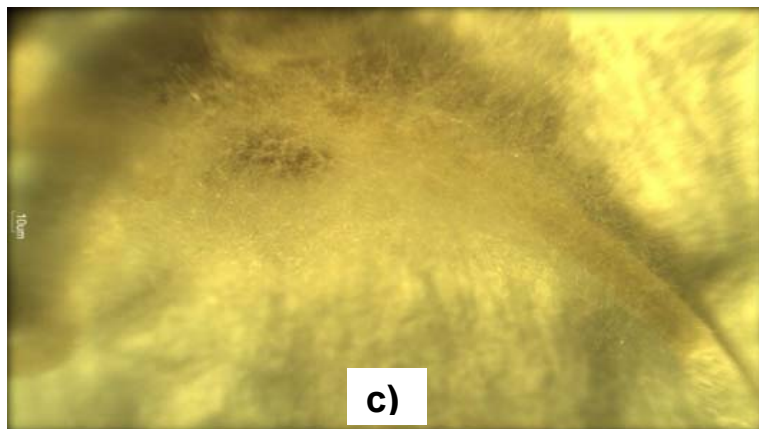


Foto: Clavijo y Parada, 2008

**Figura 12.** Detalles de las lesiones causadas por algunos de los aislamientos de *Fusarium* spp en las pruebas de patogenicidad, a y b) se observa que las semillas, a pesar de haber germinado, carecen de hojas primarias, c) el micelio del hongo *Fusarium* cubre la radícula emitida por la semilla, el aislamiento corresponde a GuM1R2.

### 6.1.2 Aislamiento de la Bacteria *Xenorhabdus bovienii*

Como se mencionó anteriormente, las colonias en *X. bovienii* en FI presentaron una forma granulada, convexa, opaca y circular con márgenes irregulares, mientras que aquellas en FII mostraron una consistencia “gomosa” y de color rojo, rosado claro o rojo-marrón. Todas las colonias en FI estuvieron rodeadas de zonas claras en el agar NBTA, porque el azul de bromotimol ha sido adsorbido lo que hace que tomen un color azul verdoso característico. En la FII, las colonias bacterianas son más grandes y no absorben colorantes, pero obtienen una coloración roja al degradarse el CTT, (Cloruro de Trifenil Tetrazolio) (Parada , Luque y Piedrahita , 2006; Martínez, 2010) como se muestra en la Figura 13.

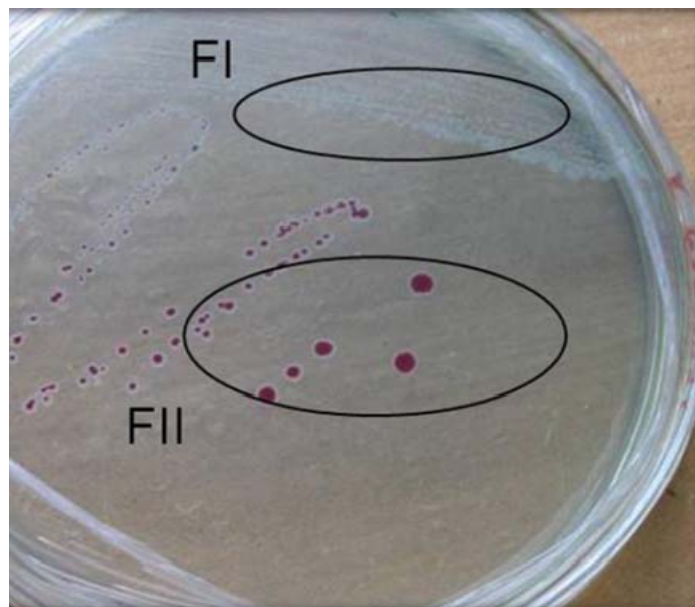


Foto: Martínez, 2010

**Figura 13.** Crecimiento de *X. bovienii* en medio NBTA, mostrando las dos fases FI y FII

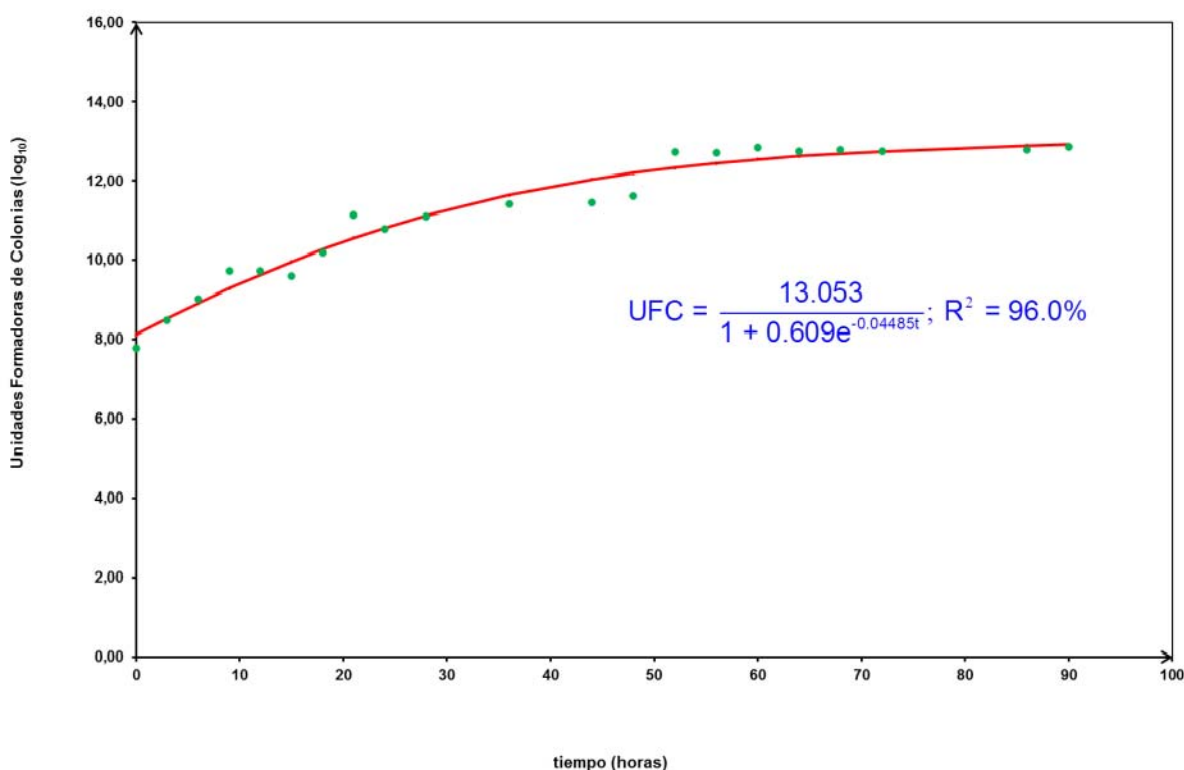
### 6.1.3 Obtención y Mantenimiento de la bacteria *Bacillus subtilis* como blanco para pruebas de antibiosis

La reactivación de la réplica de la bacteria *B. subtilis* (C-4) fue exitosa y destinada a convertirse en organismo indicador de antibiosis de *Xenorhabdus* spp (Isaacson, 2000; Xu, 1998).

## 6.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y EXTRACCIÓN DE METABOLITOS DE *X. bovienii*

**6.2.1 Cinética de crecimiento:** La curva de crecimiento fue estandarizada en el trabajo realizado por Parada *et al* (2005) y Martínez (2010). Tuvo serias dificultades pues, además de contar con el cultivo puro de la bacteria, fue necesario poner a punto el medio de cultivo y las condiciones del biorreactor, que hiciesen posible su adecuado desarrollo. Esta etapa constituyó la tesis de Maestría en Ingeniería a Química del Biólogo Javier Martínez, adelantada en la Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y analítica de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá- 2010.

Una vez se logró cultivar la bacteria en condiciones de biorreactor, se pudo observar que *X. bovienii* mantuvo un crecimiento diferente durante las 96 horas de evaluación. La mayor pendiente de la curva ocurrió durante las primeras 16-20 horas, luego continuó con un crecimiento exponencial hasta las 30-32 horas. Entre las 32 y 72- horas de permanencia en el biorreactor disminuyó la pendiente y de allí, en adelante tendió a estabilizarse, lo cual permitió considerar que la bacteria se acercó a una fase estacionaria, alrededor de las 96 horas (Figura 14).



**Figura 14.** Curva de crecimiento de la bacteria *X. bovienii* en condiciones de biorreactor durante 96 horas de cultivo continuo (Martínez, 2010).

Fue con base en el análisis de la curva de crecimiento como se tomó la decisión de muestrear los metabolitos secundarios a las 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96 horas de crecimiento bacteriano. Dado que los mayores cambios de pendiente ocurrieron en las primeras 72 horas de crecimiento, el mayor número de muestreos se centraron en este intervalo y disminuyeron entre las 72 y 96 h.

### **6.2.2 Metabolitos Secundarios de *X. bovienii* cultivado en biorreactor mediante diferentes metodologías de extracción.**

Teniendo en cuenta que la obtención de los compuestos orgánicos es clave como paso obligado dentro de las metodologías utilizadas, se reconstruyen algunos aspectos prácticos que fueron fundamentales en las extracciones efectuadas y que constituyeron adaptaciones a los registros bibliográficos consultados (Vela, *et al.*, 2009a). Aunque estas descripciones hacen parte de la metodología, se rescatan en resultados, aquellos ajustes metodológicos que se hicieron, con el fin de establecer pautas que puedan ser retomadas en trabajos de investigación posteriores.

Las primeras sesiones de ajuste metodológico se efectuaron a partir de la fracción líquida de los cultivos de *Xenorhabdus bovienii* establecidos en el biorreactor (Martínez, 2010). Las muestras volumétricas se recogieron a intervalos de 4h hasta la hora 48 y de allí en adelante, cada 8 horas hasta la hora 96. Se recogieron volúmenes comprendidos entre 150-175 mL.

Tras el primer paso por la centrifuga, se separaba el material en sobrenadante y decantado (Figura 15B). Con el fin de obtener un líquido libre de células, el sobrenadante se volvía a centrifugar en los cuatro tubos, repartiendo su volumen total en 80-85 mL de solución con 0.10 mM EDTA y 0.24 mM TRIS-HCl ajustando el pH a 7.0-8.0. Esto último con la adición de 100 gotas de solución 0.1 M de NaOH, corroborando el pH final. Luego se prosiguió a incubar a temperatura ambiente durante cinco minutos continuando con mezcla y agitación manual (Figura 15C) hasta solubilización total y formación de espuma (Figura 15D). Se dejaba reposar en hielo durante cinco minutos, llevando finalmente a centrifugación a 7000 rpm por 10 minutos.

El volumen recaudado se distribuía en tubos de centrifuga plásticos de tapa rosca y volumen máximo de 50 mL (se muestra en la Figura 15 A). En una primera corrida se vertieron sobre cuatro tubos 20 mL de extracto y se llevaron a 7000 rpm/ 20 min. Este tiempo fue establecido tras ensayos preliminares con las muestras recogidas a 3 horas. Se notó que a mayor lapso de tiempo de centrifugación no ocurrió un aumento ostensible en la cantidad de material decantado, por lo cual se tomó la decisión de hacer la separación de metabolitos cada 4 horas. En este momento de la investigación se contaba con la curva de



crecimiento de *X. bovienii* en el biorreactor, la cual confirmaba que los cambios en pendiente no ocurrían en intervalos tan cortos y que lecturas a cuatro horas eran adecuadas (Martínez, 2010). Tendencia similar había sido registrada por Triviño, Parada y Luque 2006.

Con el sobrenadante frío obtenido, se efectuó la extracción con mezcla de una parte en Diclorometano (según Li, Hu y Webster, 1998, este solvente se ha considerado adecuado para la extracción de compuestos de peso molecular medio < 750 u.m.a y polaridad intermedia como lo son derivados del indol, registrados como posibles metabolitos secundarios con actividad antibiótica, presentes el género *Xenorhabdus* y, tres partes de acetato de etilo (McInerney *et al.*, 1991, Li *et al.*, 1998) repartido en cuatro porciones para un total de mezcla de 100 mL, separando la fase orgánica correspondiente. Con el fin de controlar la formación de emulsiones, fue necesario adicionar cloruro de sodio para saturar la fase acuosa y facilitar la separación de la fracción de interés (Vela *et al.*, 2009a).

Una vez obtenida la fase orgánica, se secó con 5.0 g de sulfato de sodio anhidro y se dejó en reposo al menos por media hora a 4 °C. Finalmente se realizó una filtración al vacío con embudo Buchner (Figura 15E). Luego se evaporó el filtrado en rotavapor (Figura 15 F) para eliminar el acetato de etilo y obtener los compuestos de interés (Figura 7). En el balón receptor la muestra quedaba adherida la pared, pues lo que se recogió fue una solución pegajosa. Para recuperarla entonces se le aplicaba 5 mL etanol y se conservaba refrigerado a 4 °C para las pruebas de actividad antibiótica (Vela, *et.al.*, 2009 a; Vela, 2009).

Las adaptaciones efectuadas en la metodología para compuestos orgánicos permitieron establecer que :

a) mantener condiciones de pH cercanas a la neutralidad favorecía la mínima ionización de grupos funcionales susceptibles en la estructura de los metabolitos, lo que conducía a una mayor afinidad por solventes de media o baja polaridad del tipo halogenado (diclorometano) y ester (acetato de etilo) (Vela, 2009). Las demás metodologías siguieron patrones similares al descrito en este acápite (Vela, 2010, Vela, Leguizamó y Parada, 2009).

b) un empleo conjunto de los anteriores solventes ampliaba el marco de solubilidades que podían abarcar mayor número de metabolitos a evaluar posteriormente como posibles inhibidores de crecimiento microbiano.

c) se observó que la biosíntesis de metabolitos aparentemente sucedía antes de 48 horas, presentando máximos de actividad a las 12, 16, 28 y 32 horas, respectivamente.

d) tras el secado se obtuvo un líquido aceitoso de color ámbar y olor muy fuerte. La cantidad obtenida fue aumentando de 1 mL, hasta promedio máximo de 1,5

mL., hacia las 36h. En horas posteriores a éstas, hasta la 96Hs, el promedio de material concentrado no sobrepasó los 500  $\mu$ l.

e) aunque este modelo de extracción fue eficiente, el trabajo del rotavapor alargaba el proceso, por lo cual se consideró que en próximos ensayos podría ser conveniente liofilizar los metabolitos extraídos.



Foto vela 2009

**Figura 15.** Proceso de separación de la fase orgánica. A= centrifugado; B= decantación y desecho de células; C y D= exposición a etil acetato; E= secado y Filtrado; F= paso por rotavapor; G= concentrado de metabolitos a refrigerar.

### 6.3 RECONOCIMIENTO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE *X.bovienni*, OBTENIDOS CON LAS DISTINTAS METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN

#### 6.3.1. Sobre *B. subtilis*.

Pasadas 24 horas después de la siembra se observó la formación de halos de inhibición. Tanto el método de extracción, las concentraciones evaluadas y el tiempo arrojaron diferencias estadísticas altamente significativas, y significativas para la interacción concentración por tiempo (Tabla 4).

**Tabla 4** . Análisis de varianza del efecto inhibitorio sobre *B. subtilis* de metabolitos secundarios de *X. bovienii*

F.V.	Gli	<i>Bacillus subtilis</i>	
		CM	Pr > F
<b>Método de Extracción</b>	<b>4</b>	1,349	<.0001
<b>Concentración</b>	<b>3</b>	2,064	<.0001
<b>Tiempo</b>	<b>17</b>	0,129	<.0001
<b>Tiempo x Concentración</b>	<b>51</b>	0,023	0,0099
<b>Promedio</b>		<b>1,136</b>	
<b>CV (%)</b>		<b>9,4</b>	

Se excluyó del análisis estadístico los resultados de inhibición con los metabolitos proteicos extraídos al no presentar efecto inhibitorio tanto para *B. subtilis* como para los seis aislamientos de *Fusarium* spp.

Con respecto a métodos de extracción de metabolitos, todos con excepción de proteína, influyeron significativamente (Tabla 5). En primera categoría, se ubicaron butanol, columna de cromatografía, indol y ácidos orgánicos que no difirieron entre sí y cuyos metabolitos extraídos ocasionaron los mayores halos de inhibición de *B. subtilis*. Los promedios de los halos de inhibición en esta categoría fluctuaron entre 1.4 cm y 1.3 cm. En segunda categoría se ubicó el método del metanol, de donde se evidencia, que los metabolitos obtenidos fueron los que menor inhibición causaron al crecimiento de *B. subtilis*.

**Tabla 5.** Promedios (cm) del halo de inhibición del crecimiento de *B. subtilis* como respuesta a la exposición de los metabolitos secundarios obtenidos por los diferentes métodos de extracción analizados.

<i>Bacillus subtilis</i>		
Método	Promedio	Grupo de Duncan
BUTANOL	1,381	a
COLUMNA	1,281	a
INDOL	1,261	a
ORGANICOS	1,259	a
METANOL	0,574	b

Nota: Dentro de una misma columna, promedios con igual letra no difieren estadísticamente al nivel de probabilidad del 5%.

Con respecto a las concentraciones de los metabolitos, la mayor inhibición se logró cuando el metabolito no se diluyó (100%), seguido por la concentración media (50%) cuando, cabría esperar que fuese la correspondiente al 75% (Tabla 6). El menor halo de inhibición del crecimiento de *B. subtilis* se presentó cuando los metabolitos se diluyeron al 25%. El tamaño promedio de los halos estuvo alrededor de 1.25 cm de diámetro.

**Tabla 6.** Promedios del diámetro (mm) del halo de inhibición del crecimiento de *B. subtilis* en la medida que cambia la concentración de los metabolitos.

<b><i>Bacillus subtilis</i></b>		
<b>Concentración</b>	<b>Promedio</b>	<b>Grupo de Duncan</b>
<b>100,00</b>	1,624	a
<b>50,00</b>	1,239	b
<b>75,00</b>	1,055	c
<b>25,00</b>	0,696	d

Nota: Dentro de una misma columna, promedios con igual letra no difieren estadísticamente al nivel de probabilidad del 5%.

Con relación a la influencia del tiempo (h) al cual se extrajeron los metabolitos secundarios mediante las diferentes metodologías empleadas, se encontró que, independiente del método de extracción, la mayor antibiosis sobre *B. subtilis* se presentaba cuando los metabolitos de *X. bovienii* se extraían entre 2 y 16 horas de sembrada en el biofermentador (Tabla 7).

Los metabolitos extraídos a las 2, 4 y 16 horas, aunque con menor actividad antibiótica, no variaron significativamente con respecto a las 8 y 12 horas. De allí en adelante se observó que en la medida que se prolongó el tiempo de crecimiento de *X. bovienii*, los metabolitos extraídos disminuían su actividad inhibitoria sobre *B. subtilis*.

**Tabla 7.** Promedios de halos de inhibición (cm) del crecimiento de *B. subtilis* en los diferentes tiempos de extracción de los metabolitos secundarios.

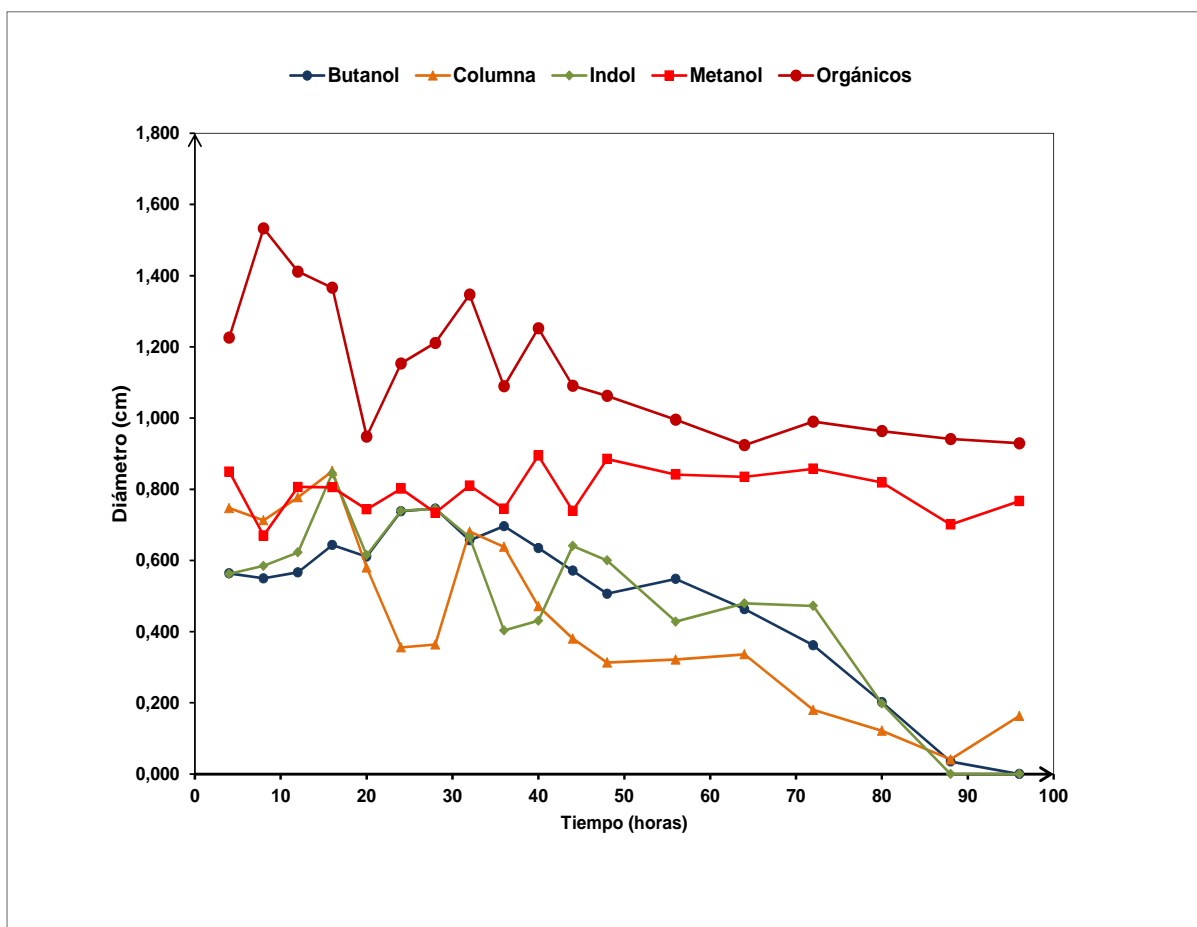
<b>Tiempo (horas)</b>	<b>Promedio</b>	<b>Grupo de Duncan</b>
<b>12</b>	1,494	a
<b>8</b>	1,482	a
<b>16</b>	1,427	ab
<b>4</b>	1,391	ab
<b>2</b>	1,340	ab
<b>24</b>	1,212	bc
<b>32</b>	1,113	cd
<b>56</b>	1,111	cd
<b>48</b>	1,104	cd
<b>44</b>	1,084	cde
<b>28</b>	1,083	cde
<b>72</b>	1,076	cde
<b>4</b>	1,058	cde
<b>36</b>	1,014	cde
<b>8</b>	0,960	def
<b>64</b>	0,939	def
<b>88</b>	0,883	ef
<b>96</b>	0,789	f

Nota: Dentro de una misma columna, promedios con igual letra no difieren estadísticamente al nivel de probabilidad del 5%.

Se encontró que mientras los metabolitos secundarios obtenidos a las 12 horas de siembra en el biorreactor ocasionaron halos de inhibición en el crecimiento de *B. subtilis* de 1.5 cm (Tabla 7), al cabo de las 28 horas éstos disminuían a 72 % y a las 96 horas, se redujeron al 52.6% de la cifra obtenida a las 12 horas. La Figura 17 permite apreciar la presencia de estos halos en diferentes situaciones analizadas.

La interacción tiempo x concentración de los metabolitos sobre *B. subtilis* (Figura 16) corroboró que cuando éstos no se diluyeron (100% de concentración) se obtuvieron los mayores controles y, que la mayor antibiosis ocurría con aquellos extraídos a las horas 12 y 8. De allí en adelante, la tendencia se redujo,

independiente de la concentración del 100%. La dilución al 25% redujo considerablemente la acción antibacteriana del extracto.



**Figura 16.** Halos de inhibición en el crecimiento de *B. subtilis* en la interacción tiempo por concentración.



Foto: Leguizamo, 2010

**Figura 17.** Halos de inhibición (cm) observados en el crecimiento de *B. subtilis* con diferentes concentraciones de compuestos orgánicos extraídos, a la hora 40 de incubación en el biorreactor.

### 6.3.2. Sobre aislamientos de *Fusarium spp*

Al exponer los seis aislamientos de *Fusarium spp* con los metabolitos extraídos de *X. bovienii* se encontró que, salvo algunas excepciones, hubo diferencias altamente significativas en los halos de inhibición en cada uno de los tratamientos e interacciones analizadas (Anexo B).

Como se dijo con anterioridad, se excluyó del análisis estadístico los resultados con los metabolitos proteicos extraídos sobre *B. subtilis* como tampoco para los seis aislamientos de *Fusarium* evaluados.

La inhibición en el crecimiento de los aislamientos de *Fusarium spp* varió significativamente ante la presencia de los metabolitos secundarios de *X. bovienii* extraídos con las diferentes metodologías (Tabla 8), con excepción de proteína. Mientras que algunos de ellos (BTU2; GuM5R2) mostraron su mayor inhibición ante metabolitos extraídos con butanol, otros (GuM1R2, Gu M6R1, SETM1M4, SETMF1M6) lo hicieron con aquellos obtenidos con ácidos orgánicos. La



respuesta de inhibición del crecimiento fungoso fue menos exitoso con los metabolitos extraídos con columna de cromatografía e indol.

**Tabla 8.** Promedios de halos de inhibición (cm) de los 6 aislamientos de *Fusarium* spp expuestos a los metabolitos de *X. bovienii* obtenidos mediante cinco métodos de extracción.

AISLADO	MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS				
	Halos de inhibición (cm)				
	BUTANOL	METANOL	ORGÁNICOS	INDOL	COLUMNA
<b>BTU2</b>	0.80 a	0.73 b	0.59 c	0.54 d	0.48 e
<b>GUM1R2</b>	0.52 d	0.73 b	0.80 a	0.56 cd	0.58 c
<b>GUM5R2</b>	0.94 a	0.64 c	0.73 c	0.81 b	0.95 a
<b>GUM6R1</b>	0.51 d	0.74 b	0.88 a	0.58 c	0.56 c
<b>SETM1M4</b>	0.49 c	0.79 b	1.13 a	0.49 c	0.43 d
<b>SETMF1M6</b>	0.45 e	0.73 b	0.81 a	0.62 c	0.53 d

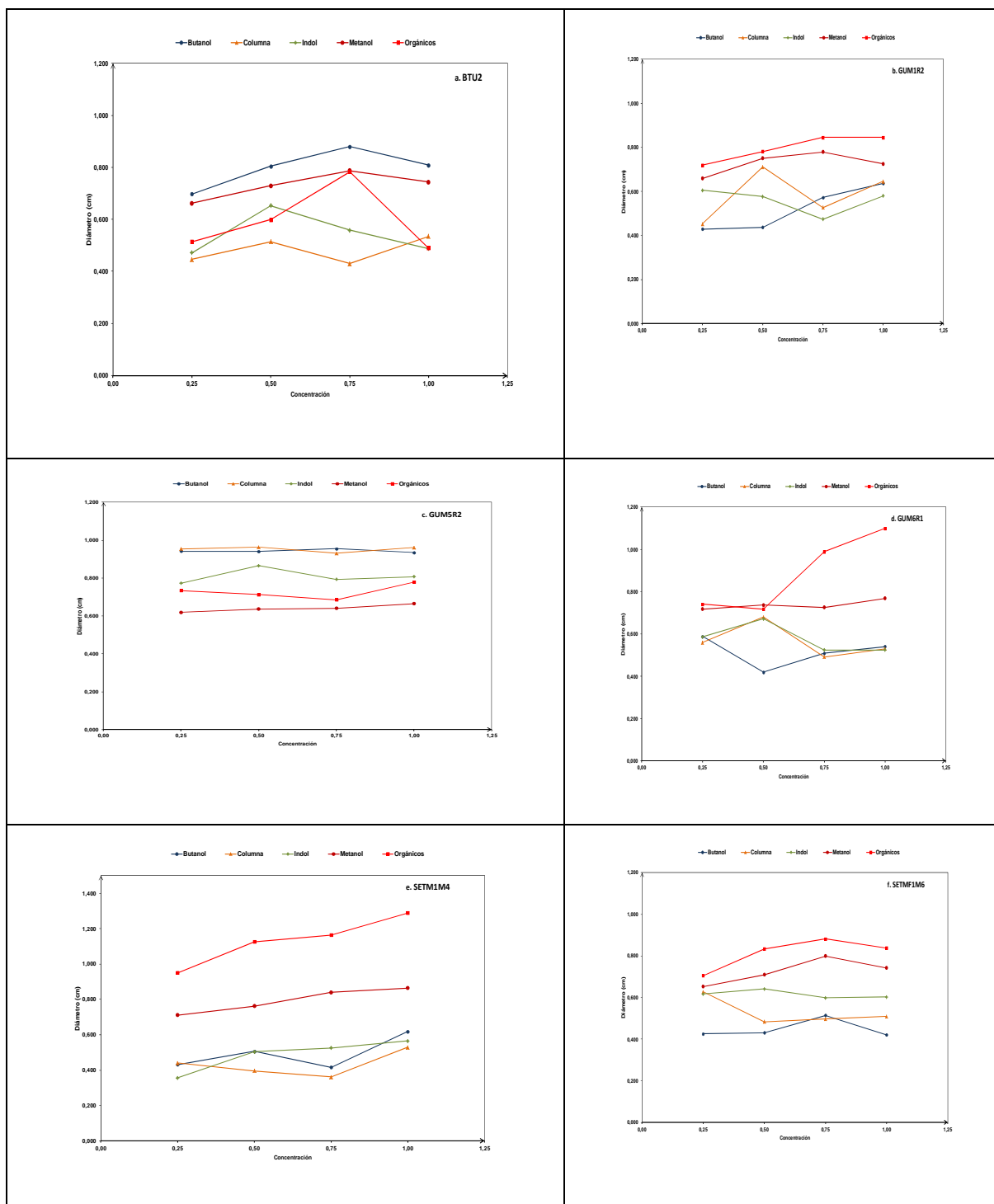
Los halos de inhibición de los seis aislamientos de *Fusarium* spp variaron con la concentración de los metabolitos. Al 100% se presentaron halos de inhibición más grandes en la mayoría de casos: GuM1R2, GuM5R2, GuM6R1, SETM1M4 (Tabla 9, Figura 18). A concentraciones de 50% y 75% de los metabolitos extraídos, se presentaron los mayores valores inhibitorios en BTU2, sin diferencias significativas entre ellas. En SETMF1M6 no hubo diferencias significativas en respuesta ante las diferentes concentraciones.

**Tabla 9.** Promedios de halos de inhibición (cm) de los 6 aislamientos de *Fusarium* spp expuestos a las diferentes concentraciones de los metabolitos de *X. bovienii* obtenidos mediante cinco métodos de extracción.

AISLADO	CONCENTRACIÓN DE LOS METABOLITOS			
	0.25	0.50	0.75	1.00
<b>BTU2</b>	0.56 c	0.66 a	0.68 a	0.61 b
<b>GUM1R2</b>	0.57 c	0.65 ab	0.64 b	0.68 a
<b>GUM5R2</b>	0.80 a	0.82 a	0.80 a	0.83 a
<b>GUM6R1</b>	0.64 b	0.64 b	0.64 b	0.68 a
<b>SETM1M4</b>	0.60 c	0.66 b	0.68 b	0.78 a
<b>SETM1M6</b>	0.60 a	0.62 a	0.65 a	0.62 a

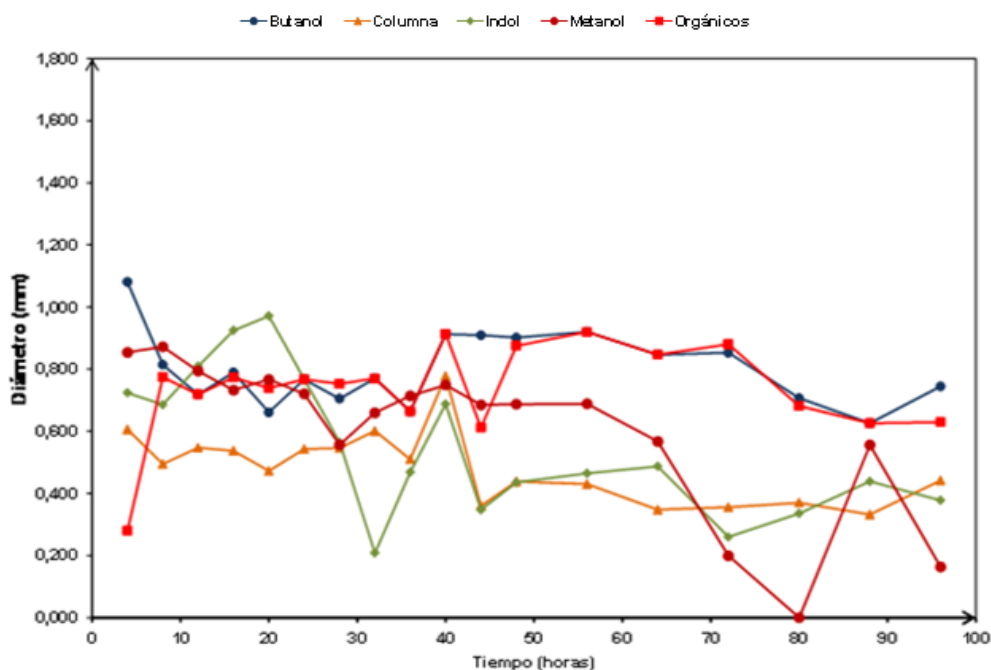
El aislamiento BTU2 presentó la máxima inhibición con los metabolitos extraídos a las 40h, sin embargo, no difirió significativamente de los resultados obtenidos con aquellos extraídos a las horas 8, 12, 16, 20 y 24. A este comportamiento se acerca GUM5R2, quien también presentó su máxima inhibición con metabolitos extraídos a las 40 h, sin diferir significativamente con respecto a las 12, 16, 20, 24, 28, 32, 48 y 56 horas (Figura 18). GUM1R2 redujo su crecimiento significativamente con los metabolitos obtenidos más temprano: 12, 16 y luego prolongan su respuesta, sin diferir significativamente, con metabolitos obtenidos 4, 8, 20, 24, 28, 32, 48, 56 y 80 horas.

Las mayores inhibiciones en GuM6R1 y SETF1M6, se obtuvieron con metabolitos obtenidos a las 4 h de incubación, pero nuevamente la respuesta es difusa, pues en un amplio número de horas de extracción no se observaron diferencias significativas.



**Figura 18.** Tendencias observadas en el efecto de la concentración de los metabolitos extraídos sobre la inhibición (cm) del crecimiento de seis aislamientos de *Fusarium* spp.

También hubo diferencias significativas en el crecimiento general de *Fusarium* spp, ocasionadas por la interacción del tiempo de incubación (h) al cual se obtuvieron los metabolitos en las distintas metodologías de extracción (Figura 19, Anexo C). Independiente de la metodología, los mayores picos de inhibición se presentaron con la exposición de los aislamientos a los metabolitos obtenidos antes de las primeras treinta y dos horas del cultivo de *X. bovienii*.



**Figura 19.** Promedios de halos de inhibición (cm) de *Fusarium* spp en función del tiempo de obtención de los metabolitos a través de las diferentes metodologías de extracción.

Estos resultados indicaron la imposibilidad de generalizar una respuesta inhibitoria de los seis aislamientos fungosos a los metabolitos secundarios extraídos en los diferentes tiempos estudiados.

### 6.3.2.1 Cambios en la esporulación y formación de clamidosporas de los seis aislamientos de *Fusarium* spp.

El análisis de varianza (Tabla 10) mostró que hubo diferencias altamente significativas entre aislamientos y medios de cultivo (CLA y SNA) utilizados en la expresión de macro y microconidias de *Fusarium* spp (Figura 20), mas no en clamidosporas, en las cuales sólo se detectaron cambios entre medios de cultivo. El tiempo de incubación en el cual se extrajeron los metabolitos secundarios

también tuvo una alta influencia en estas tres variables. Las interacciones dobles y triples fueron en algunas de ellas altamente significativas.

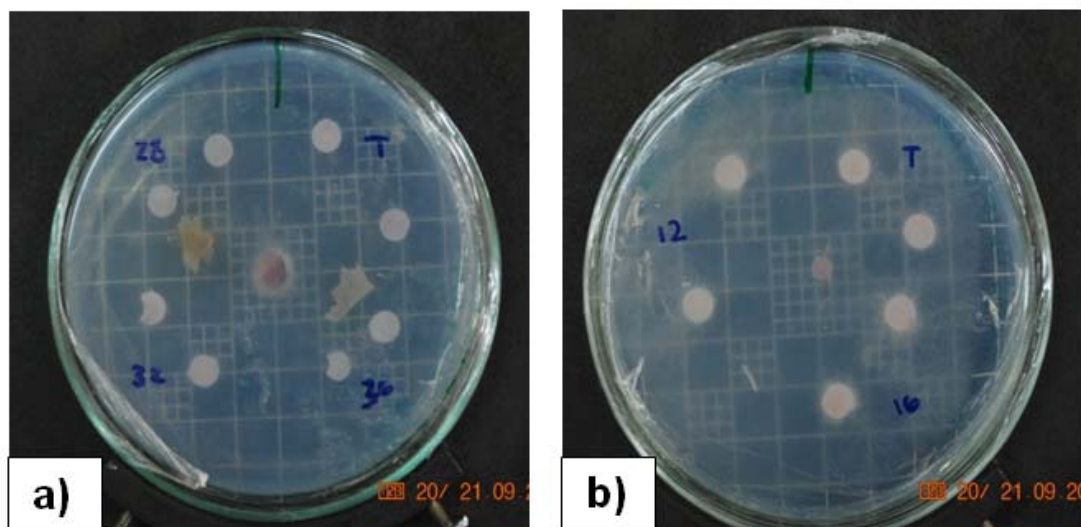


Foto Leguizamo, 2010

**Figura 20.** *Fusarium* spp creciendo en dos medios a) CLA y b) SNA

**Tabla 10.** Análisis de varianza para detectar posibles cambios en micro, macroconidias y clamidosporas de los aislamientos de *Fusarium* enfrentados a los metabolitos obtenidos por las diferentes metodologías utilizadas.

F.V.	Gli	Macroconidias		Microconidias		Clamidosporas	
		CM	Pr > F	CM	Pr > F	CM	Pr > F
Aislamiento	5	440933,8	<.0001	1943895,3	<.0001	1312,0	0,1622
Medio	1	43447,0	<.0001	153365,7	<.0001	7743,2	0,0023
Aislamiento x Medio	5	4893,0	0,0282	27347,6	0,0057	3528,2	0,001
Tiempo	17	7856,6	<.0001	39055,5	<.0001	2260,2	0,0003
Tiempo x Aislamiento	85	2643,2	0,0245	13574,5	0,0007	1650,4	<.0001
Tiempo x Medio	17	1690,8	0,6040	6146,6	0,7501	1284,5	0,0729
Tiempo x Aislamiento x Medio	85	2127,3	0,2684	5794,4	0,9740	1543,5	<.0001
Promedio		324,0		645,0		172,8	
CV (%)		13,6		14,0		16,6	

Para las macroconidias, las interacciones no presentaron diferencias significativas lo que puede indicar que la presencia y expresión de estas estructuras solo son dependientes del medio de cultivo y del tiempo de muestreo, como se muestra en la (Tabla 10), donde los dos medios empleados muestran diferencias significativas, siendo el SNA el que más favoreció la formación de dichas estructuras (Tabla 11).

Para la formación de microconidias, tampoco fue significativo el efecto de las interacciones, pero sí del medio de cultivo, aislamiento y tiempo de extracción de los metabolitos. De igual forma el medio SNA (Tabla 11) favoreció la expresión de microconidias.

**Tabla 11.** Influencia de los dos medios de cultivo probados en la expresión de macro, microconidias y clamidosporas de los seis aislamientos de *Fusarium* spp.

Macroconidias			Microconidias			Clamidosporas		
Medio	Promedio	Grupo de Duncan	Medio	Promedio	Grupo de Duncan	Medio	Promedio	Grupo de Duncan
SNA	332,2	a	SNA	660,4	a	CLA	176,3	a
CLA	315,8	b	CLA	629,6	b	SNA	169,4	b

Nota: Dentro de una misma columna, promedios con igual letra no difieren estadísticamente al nivel de probabilidad del 5%.

Para el caso de las clamidosporas, el medio de cultivo más favorable fue el CLA, debido probablemente a que este medio carece de fuentes de carbohidratos, lo cual estimula la formación de estructuras de resistencia ya que es muy complicado mantenerse por mucho tiempo en este tipo de medios, en condiciones normales, sin producir estructuras de resistencia.

Con relación a la influencia del tiempo de extracción de los metabolitos (Tabla 12) sobre la expresión de estructuras reproductivas y clamidosporas de los seis aislamientos de *Fusarium* spp, se encontró que la mayor cantidad de macro y microconidias se produjo cuando los aislamientos se expusieron a metabolitos extraídos después de más de 32 h de incubación del cultivo de *X.bovienii* y se incrementaron con el tiempo (mayor número a las 96h). Esto corroboró que la acción inhibitoria de los metabolitos descendió en la medida que se incrementaba el tiempo de incubación del cultivo bacteriano, como lo mostraron los resultados anteriores, independiente del método de extracción (Figuras 19).

Con relación a la formación de clamidosporas (Tabla 12) la tendencia fue similar, con excepción de una respuesta temprana con los metabolitos obtenidos a las 4 h,

que fueron los más altos valores alcanzados en esta variable y no difirieron significativamente de los resultados obtenidos a las 32 h.

**Tabla 12.** Influencia del tiempo (h) de extracción de los metabolitos secundarios sobre la expresión de macro, microconidias y clamidiosporas de los seis aislamientos de *Fusarium* spp

Macroconidias			Microconidias			Clamidiosporas		
Tiempo (horas)	Promedio	Grupo de Duncan	Tiempo (horas)	Promedio	Grupo de Duncan	Tiempo (horas)	Promedio	Grupo de Duncan
96	352,3	a	96	706,2	a	32	189,2	a
72	339,2	ab	72	678,6	ab	4	188,8	a
80	336,0	ab	80	672,2	abc	88	179,6	ab
64	336,0	ab	64	671,9	abc	96	178,6	abc
56	335,7	ab	56	671,4	abc	80	176,1	abc
32	334,8	ab	32	669,5	abc	48	175,9	abc
88	334,2	ab	88	668,6	abc	72	175,6	abc
48	330,1	abc	48	660,3	abcd	44	173,3	bc
44	328,3	bcd	44	656,6	bcd	56	172,4	bc
4	326,5	bcd	40	646,2	bcd	64	172,3	bc
40	323,1	bcd	36	634,9	bcde	40	171,6	bc
36	317,4	bcde	8	626,7	cdef	36	0,9	bc
12	309,6	cde	12	619,1	def	28	170,7	bc
28	308,6	cde	28	617,2	def	24	165,5	bc
20	308,2	cde	20	616,4	def	8	165,5	bc
24	308,1	cde	24	616,2	def	12	164,2	bc
8	305,8	de	16	597,1	ef	16	162,7	c
16	298,5	e	4	581,3	f	20	162,3	c

Nota: Dentro de una misma columna, promedios con igual letra no difieren estadísticamente al nivel de probabilidad del 5%.

#### 6.4. PRUEBAS DE FITOTOXICIDAD EN TOMATE CON LOS METABOLITOS OBTENIDOS A PARTIR DE *X. bovienii* POR LAS DIFERENTES METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN

A los 10 días de permanencia en cámara de crecimiento las plántulas de tomate alcanzaron en promedio 10 cm de longitud (Figura 21a) y presentaban un desarrollo normal, independiente de los tratamientos evaluados.

En las concentraciones de 100%, 75%, 50% y 25% de los metabolitos obtenidos mediante las diferentes metodologías, los porcentajes de germinación y

emergencia de las plantas se mantuvieron en general, alrededor del 95 -98% (Figura 21 b). El desarrollo alcanzado por las plántulas sumado a la ausencia de decoloraciones, manchas y/o malformaciones, permitieron afirmar que los metabolitos obtenidos del cultivo de *X. bovienii* mediante las diferentes metodologías y las concentraciones empleadas no representaron riesgos para el desarrollo vegetativo del tomate, bajo las condiciones en las cuales se realizó esta prueba.



Foto Leguizamo, 2010

**Figura 21.** Efecto de las diferentes concentraciones de los metabolitos obtenido del cultivo de *X. bovienii* en diferentes tiempos de muestreo y metodologías, desarrollo de plántulas a los 10 días de inoculadas con los metabolitos.



## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 LA BÚSQUEDA DE *Fusarium* spp, *B. subtilis* y *X. bovienii*

El cumplimiento del primer objetivo de esta investigación mostró que *Fusarium* spp a pesar del tiempo de estudio e investigaciones realizadas en torno a su control, continúa siendo un limitante microbiano importante en los diferentes cultivos y en especial, el que ocupa este trabajo: el tomate. Regiones que se han caracterizado por ser productoras de este cultivo han limitado o reemplazado su siembra, puesto que cuando se presenta el ataque de este patógeno, aunado a insectos plaga, las medidas de control con productos de síntesis química industrial no son suficientes para frenar su avance y daño que causa.

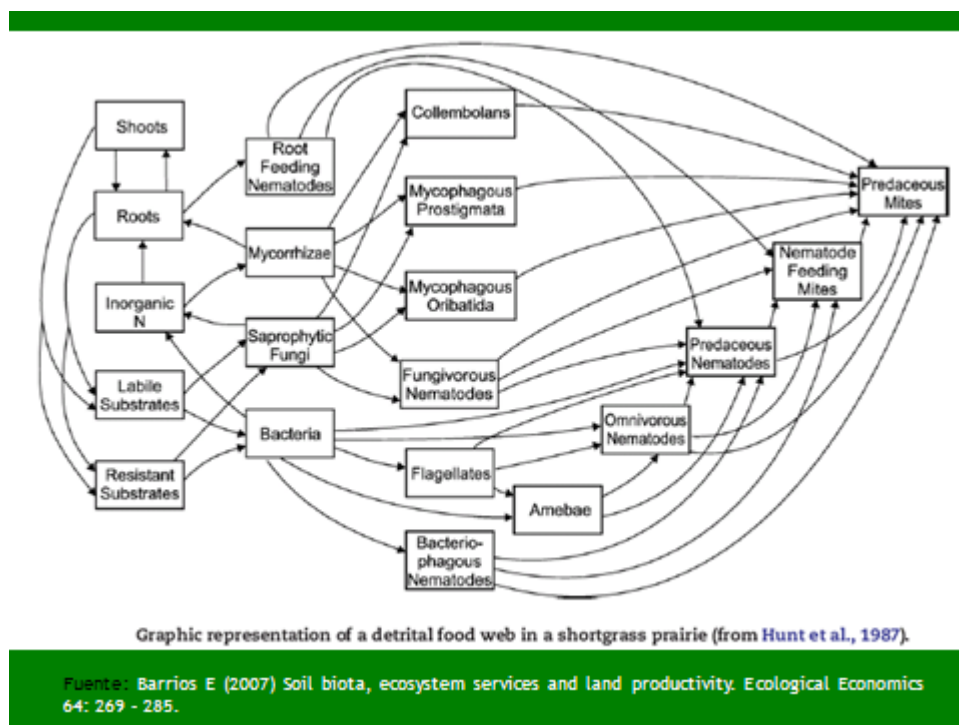
Como se pudo observar, los hongos aislados son habitantes naturales del suelo y la rizosfera de diferentes cultivos entre ellos, el tomate. Allí forman parte de grupos funcionales que participan en descomposición de materia orgánica (todos ellos), solubilización de fosfatos (por ejemplo, *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Fusarium*), ejercen control biológico sobre otros *microorganismos del suelo* (caso de *Penicillium*, *Trichoderma* y *Aspergillus*), participan en la agregación del suelo (*Aspergillus*, *Trichoderma*, *Rhizoctonia*) y establecen múltiples relaciones en el suelo (Sánchez de P. *et al.*, 2007; Wheatley, 2008; Lambers *et al.*, 2009).

Algunos de esos hongos producen micotoxinas que pueden afectar la salud humana y animal al trasladarse a las redes alimentarias. Se ha registrado que especies del género *Fusarium* producen más de cien micotoxinas, entre las más importantes por su efecto letal, están las fumonisinas y trichothecenos (Gómez 2009, Daza 2010) Varios están registrados como parásitos en diferentes cultivos. Tal es el caso de *Fusarium* spp, objeto de esta búsqueda y otros como *Cladosporium*, *Curvularia*, *Rhizoctonia* y *Botryodiplodia* (Sánchez de P. *et al.*, 2007).

El encontrar que los trece aislamientos de *Fusarium* spp logrados en los muestreos realizados, expresaran actividad patogénica variable entre ellos, constituye un ejemplo de la complejidad de las relaciones que ocurren en el suelo y especialmente en ese espacio denominado rizosfera de las plantas, en este caso en el cultivo del tomate.

Con respecto a *Xenorhabdus bovienii* y *Bacillus subtilis*, estas dos bacterias ilustran también la complejidad de las relaciones en el suelo. Autores como Hunt et al., 1987, discutidos por Barrios (2007), al describir las redes tróficas que ocurren en él (Figura 22), normalmente presentan los diferentes componentes de la trama de la vida que ocurre en torno a la materia orgánica, como constituidos por componentes individuales, organizados en poblaciones. Sin embargo, casos como el nematodo *Steinernema feltiae* y su simbiote *Xenorhabdus bovienii* ilustran que no se trata de organismos individuales, sino de grupos ligados íntimamente como en el caso de las simbiosis y/o asociados en diferente grado, que asumen papeles funcionales diversos. Cada vez se incrementan los registros de presencia de simbiosis donde anteriormente se pensaba que había individualidades (Capra, 2003, Parada, et al., 2006, Abelleira 2010, Patiño et al., 2011).

En cuanto a *B. subtilis*, su uso en este trabajo y en otras investigaciones (Isaacson, 2000; Xu, 1998), como organismo indicador ha obedecido a la existencia de registros de esta especie como altamente sensible a cambios en la actividad antibiótica de *Xenorhabdus* spp hecho que quedó plenamente demostrado en esta investigación.



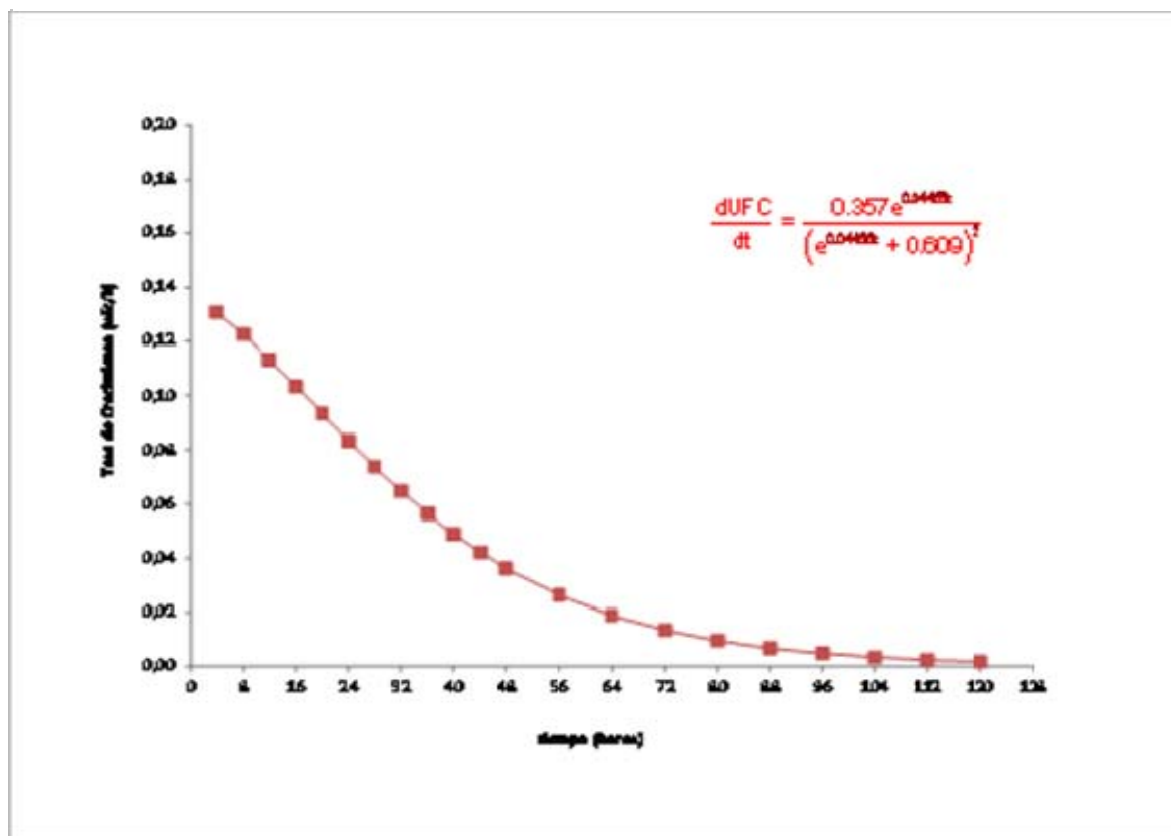
**Figura 22.** Diagrama de redes tróficas y sus componentes a partir de los materiales orgánicos en el suelo.

## **7.2. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *X. bovienii* Y EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR DIFERENTES METODOLOGÍAS.**

El estudio de la cinética de crecimiento de *X. bovienii* fue posible debido al conocimiento de medios de cultivo específicos, lo cual ha permitido que se realicen investigaciones como la presente y aproximarse a la contribución en el control que ejerce *S. feltiae* – *X. bovienii* sobre insectos, y, al mismo tiempo, la actividad biocontroladora de otros microorganismos que puede desarrollar esta bacteria, mediante los cambios que ocasiona a través de la secreción de metabolitos (Sánchez de P., Parada y Jiménez, 2010)

Las mayores pendientes en la curva de crecimiento de *X. bovienii* en las primeras horas de incubación que se prologan hasta 40 h y más, probablemente puedan asociarse a la disponibilidad de medio de cultivo y condiciones ambientales, pues el sistema en el biorreactor lo permitía (Martínez, 2010). Con ello se logró quizás, que las condiciones de competencia por espacio y recursos nutricionales generaran menos estrés que las que se pueden presentar en una caja de Petri.

Sin embargo, el análisis de la tasa de crecimiento de la bacteria (Figura 23), mostró que a pesar la tendencia observada, posiblemente relacionada con la escala métrica utilizada, después de las 8 horas de incubación, realmente el crecimiento poblacional de la bacteria se afectaba, con una caída fuerte hasta las 40h y, a partir de allí el crecimiento poblacional se tornaba casi nulo.



**Figura 23.** Tasa de crecimiento de *X. bovienii* en biorreactor por a través de 120h de muestreo.

Dentro del concepto de “quórum sensing” (Bizkaia, 2003), el aumento de la población bacteriana es fundamental para que los metabolitos secundarios se expresen al igual que su acción. El presente trabajo corrobora dichas afirmaciones: entre las 8 y 12 h de incubación de *X. bovienii* ocurrió su mayor crecimiento poblacional y, también, los metabolitos obtenidos en estas horas (independiente del método de extracción) mostraron su mayor acción, expresada en términos de máxima inhibición del crecimiento de *B. subtilis* y *Fusarium* spp.

El estudio del ciclo de vida de *X. bovienii* en simbiosis con *S. feltiae*, ha revelado que apenas la bacteria es liberada por el nematodo (si se llama a esta hora, la hora 0), se multiplica rápidamente y produce varios metabolitos destinados a superar el sistema inmunológico del insecto que les sirve como hospedero, ocasionándole muerte por septicemia dentro de las 24-48 horas siguientes. Distintos investigadores han registrado que cuando las larvas de los insectos son invadidos por un cuerpo extraño, en este caso las bacterias simbiotes del nematodo, se generan reacciones inmunológicas, presentadas en la hemolinfa

como defensa celular y humoral, hay inhibición en su desarrollo, reproducción y ocurre la muerte del insecto (Kaya y Gaugler, 1993; Boemare *et al.* 2007; Li, *et al.*, 1997; Molina, 2007; Chavarria-Hernández *et al.*, 2008).

Fuera de ello, se ha encontrado que *X. bovienii* al tiempo que digiere el insecto hospedero y lo deja disponible para ser utilizado como alimento de *S. feltiae*, produce metabolitos secundarios con el fin de evitar la infección y proliferación de organismos oportunistas (hongos, bacterias e inclusive otros nematodos) en el cadáver de la larva parasitada por *S. feltiae*. Es precisamente a partir de este conocimiento donde surge la posibilidad biotecnológica de la bacteria de ser usada con fines de biocontrol sobre microorganismos fitopatógenos (Boyce, 1995; Zahner and Fiedler, 1995; Xu, 1998; Park and Kim, 2005, Vergara 2004, Chavarria- Hernández, *et. al* 2008).

También se ha encontrado que la presencia de estos compuestos antimicrobianos producidos por *Xenorhabdus* spp. depende de las horas de muestreo y de las los métodos de extracción que se utilizan para tal fin, algunos de los metabolitos reconocidos en trabajos revisados corresponden a: xenorhabdinas, nematophinas y xenocumacinas, entre otros (Wang *et al.*, 2011).

Con respecto a la extracción que se hizo de los metabolitos de *X. bovienii* a través de seis metodologías, se logró establecer que el pH fue factor fundamental en los resultados obtenidos. El sostenerlo en condiciones cercanas a la neutralidad disminuyó la ionización que los grupos funcionales susceptibles de la estructura de los metabolitos, lo cual permitió una afinidad mayor con solventes de media y baja polaridad, por ejemplo, los de tipo halogenado como el diclorometano y tipo éster como el acetato de etilo (Vela, 2010). Esto permitió el empleo conjunto de estos dos solventes, lo cual amplió las posibilidades de extracción de metabolitos producidos en el cultivo que se hizo de esta bacteria.

La extracción de los compuestos orgánicos fue clave como paso obligado dentro de las metodologías utilizadas La mayor extracción de metabolitos del cultivo de *X. bovienii*, independiente de la metodología coincidió con los máximos de actividad de crecimiento de la bacteria y ocurrió entre las 8-12 h, prolongándose hasta 16, 28 y 32 horas, respectivamente. No se encontraron registros bibliográficos sobre *X. bovienii* y, aparentemente, este trabajo es pionero sobre el tema.

Las metodologías empleadas para estas extracciones son costosas pues requiere disponer de equipos adecuados y reactivos de alta pureza. Fuera de ello, la cantidad obtenida de los metabolitos es muy baja y, como era de esperarse, varió con el tiempo de incubación del cultivo bacteriano. Por ejemplo, en el caso de la extracción de compuestos orgánicos, la cantidad obtenida fue aumentando de 1 mL, hasta promedio máximo de 1,5 mL/100 mL, hacia las 36h de incubación de *X.*

*bovienii*. En horas posteriores a éstas, hasta la 96 h, el promedio de material concentrado no sobrepasó los 500 µl.

Con algunas de estas metodologías existen estudios acerca del tipo de metabolitos que se logran extraer, tal es el caso de la extracción de compuestos orgánicos y proteínas donde se ha registrado que se concentran metabolitos con actividad antibiótica de amplio espectro (Forst *et al.*, 1997; Cabral *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2011). Con indol se ha registrado la obtención de xenorhabdinas con actividad antibiótica (Li y Zhang, 2008). Mediante la metodología de extracción con metanol, Webster y Chen, 1998; Wang *et al.*, 2008; Vela 2010, han registrado la posible obtención de xenocumacinas. A través de la columna de cromatografía otras xenocumacinas, que no se pueden extraer con el método de metanol (Webster y Chen, 1998; Torrenegra y Baquero, 2005), al igual que ampliar la eficiencia de extracción de algunos de estos metabolitos, mediante butanol (Cabral *et al.*, 2004).

En la presente investigación, no se desarrolló la identificación de los metabolitos presentes y obtenidos a partir de los cultivos de *X. bovienii*, teniendo en cuenta que esta actividad requería incurrir en costos no incluidos en el presupuesto inicial y carecer de recursos para hacerlo, pues no sólo se requería de reactivos sino también de equipos que no estaban disponibles en la Universidad en las tres Facultades que colaboraron para adelantar los ensayos (Facultad de Ciencias Agropecuarias, Palmira, F. de Agronomía y Facultad de Ciencias, Bogotá).

### **7.3 RECONOCIMIENTO DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE LOS METABOLITOS EXTRAÍDOS DEL CULTIVO DE *X. bovienii* sobre *Bacillus subtilis* y *Fusarium* spp.**

La actividad antibiótica ejercida sobre *B. subtilis* por los metabolitos extraídos del cultivo de *X. bovienii* mediante las diferentes metodologías empleadas, con excepción de proteínas, corroboró que esta especie es altamente sensible a la actividad antibiótica de los metabolitos extraídos de esta bacteria simbiote durante las primeras 24 horas de incubación y especialmente a concentraciones del 100% (Isaacson, 2000; Xu, 1998).

Cuando dichos metabolitos se probaron sobre los seis aislamientos de *Fusarium* seleccionados, se encontró que éstos variaban en su respuesta a cada uno de los compuestos extraídos. Sin embargo había coincidencia con *B. subtilis* en el sentido de que los metabolitos inhibían su crecimiento y por lo tanto, ejercían actividad antibiótica sobre estos cultivos fungos.

Cuatro de los seis aislamientos de *Fusarium* spp, presentaron su mayor inhibición al ser expuestos a los compuestos obtenidos con butanol y con compuestos orgánicos, no fueron afectados por los compuestos extraídos con proteínas y en menor proporción por aquellos metabolitos extraídos con indol y con metanol.

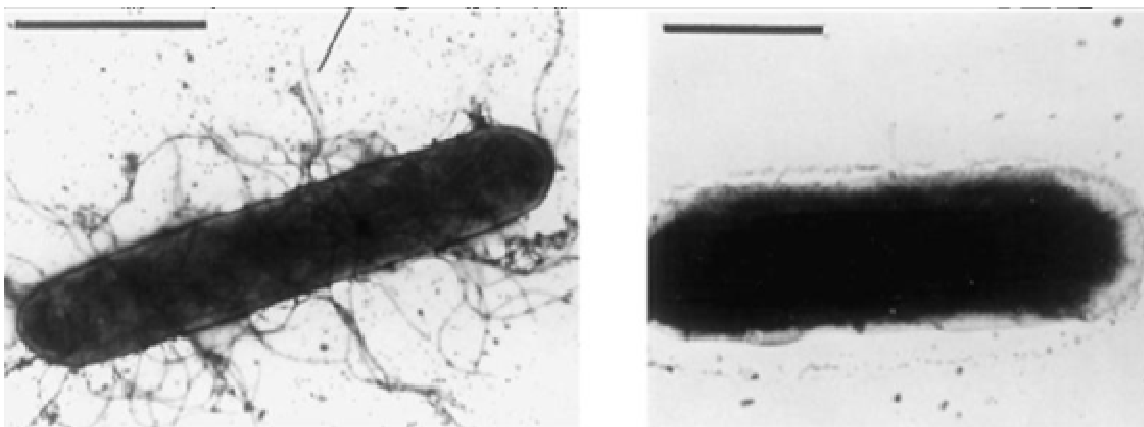
La respuesta inhibitoria de los aislamientos fue variable con la concentración de los metabolitos empleados y con respecto al tiempo de extracción de estos metabolitos, aunque hubo coincidencia en que los mayores halos de inhibición ocurrieron con los compuestos recuperados durante las primeras 40 h de incubación.

En cuanto a la presencia de macro, microconidias y clamidosporas en los aislamientos de *Fusarium* spp, independiente del método de extracción de los metabolitos, se encontró que fueron menores cuando se expusieron a metabolitos obtenidos durante las primeras horas de incubación y se incrementaron con el tiempo. Es decir, que los metabolitos extraídos de *X. bovienii* durante las primeras horas de incubación ( 4 – 40 h) no sólo inhibieron el crecimiento vegetativo fungoso (cm/h), sino también las estructuras reproductivas (macro, microconidias y clamidosporas) y que el efecto de biocontrol se fue reduciendo en la medida que se incrementaba el tiempo de incubación.

En esta etapa, como aporte complementario, se encontró que los medios de cultivo con los cuales se interrogaba la expresión de estas estructuras de *Fusarium* spp, influyeron significativamente en su respuesta. Con CLA se logró contar mayor cantidad de clamidosporas y con SNA, de macro y microconidias.

En la búsqueda de explicación a los resultados obtenidos en la presente investigación, en varios estudios han encontrado que la mayor producción de metabolitos secundarios por parte de *X. bovienii* ocurre en FI como estado enzimático que se encarga de la descomposición de las proteínas, carbohidratos y lípidos al interior del hospedero insectil (Boemare y Akhurst, 1988; Forst y Clarke, 2002, Pérez *et al.*, 2006; Martínez 2010).

En este estado FI se han detectado cambios morfológicos, entre ellos la presencia de flagelos, que luego desaparecen en la FII y respuesta diferencial sobre compuestos como el CTT (Figura 13). Se ha afirmado entonces que es en FI donde ocurre la máxima actividad antibiótica de *X. bovienii* y cambios morfológicos, captados por Forst y Clarke (2002) a través de microscopía electrónica de barrido (Figura 24).



**Figura 24.** Observación de *Xenorhabdus bovienii* con microscopio electrónico. Forma primaria (FI) flagelada y la Forma secundaria (FII). Tomada de Forst y Clarke (2002) y referenciada en Martínez (2010).

Wee *et al.*, 2000 han encontrado que algunos metabolitos secretados por la FI de *Xenorhabdus* presentan menor actividad cuando son secretados por la FII. Tal es el caso de las proteasas, implicadas en la degradación de las proteínas de los insectos para proveer nutrientes asimilables tanto para la bacteria como para el nematodo.

Estos resultados indicaron que al igual que con *B. subtilis*, los metabolitos obtenidos de los cultivos de *X. bovienii*, presentaron diferente capacidad inhibitoria sobre los seis aislamientos de *Fusarium* spp (en su fase vegetativa y reproductiva), lo cual imposibilitó generalizar una respuesta.

La respuesta obtenida en la presente investigación coincidió con otros estudios y validó a *Fusarium* spp como agente fitopatogénico con posibilidad de ser controlado mediante los metabolitos producidos por *X. bovienii*. En ensayos de laboratorio, se ha encontrado que varios de los metabolitos secundarios de *X. bovienii* (algunos sin especificar metodología de extracción) han inhibido un amplio espectro de hongos patógenos de plantas como *Botrytis cinerea*, *Ceratocystis ulmii*, *Mucor pitifomis*, *Pythium coloratum*, *P. unimum*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani* (Chen *et al.*, 1994; Xu, 1998, Ng y Webster 1997, Pinyon, Hing y Connor, 2010).

Aun cuando los resultados se mostraron dispersos, señalaron potencialidades de biocontrol de *Fusarium* spp por parte del cultivo de *X. bovienii*, considerando, posiblemente no metabolitos aislados sino el medio de cultivo en su conjunto (compuestos integrantes del medio ricos en nutrientes, metabolitos secretados por la bacteria e inclusive, las poblaciones de *X. bovienii*).



Esto plantearía una alternativa biotecnológica cuando *X. bovienii* se cultiva en biorreactor con destino a formar simbiosis con *S. feltiae*, donde el producto principal a recoger es la población de nematodos, con destino a ser comercializados como producto puro y concentrado (Sánchez de P., Parada y Jiménez, 2010).

En este proceso biotecnológico, los excedentes que de otra forma se considerarían como “desecho o residuo” podrían también ser comercializados como bioinsumos con diferentes fines. Sería necesario investigar detalles complementarios como la estabilización del medio de cultivo para que permanezca la acción de los metabolitos, el vehículo o vector a utilizar para su aplicación, efecto sobre los cultivos donde se podría aplicar, sobre otros microorganismos del suelo, costos e inocuidad ambiental, entre otros.

Por ejemplo, se ha investigado que los entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopilae* no han sido afectados por la presencia de algunos de estos metabolitos (Chen et al., 1994; Xu, 1998, Ng y Webster 1997, Pinyon, Hing y Connor, 2010). Ng y Webster 1997, encontraron que los metabolitos solubles en compuestos orgánicos de *Xenorhabdus bovienii* controlaron *P. infestans* en cultivos de papa con mínima fitotoxicidad. Falta información acerca de las condiciones de aplicación.

#### **7.4. EFECTO FITOTÓXICO DE LOS METABOLITOS EXTRAÍDOS DE *X. bovienii* SOBRE TOMATE *Solanum lycopersicum* L., VARIEDAD SANTA CLARA**

El suelo donde se efectuó el ensayo con el objetivo de observar si estos metabolitos presentaban actividad tóxica sobre tomate, se caracterizó taxonómicamente como *Typic Hapludands*, perteneciente al orden de los andisoles (USDA, 2010). Con el fin de particularizar, se puede afirmar entonces, que en las condiciones de este suelo, los metabolitos obtenidos del cultivo de *X. bovienii* y las concentraciones empleadas no representaron riesgos para el desarrollo vegetativo del tomate, bajo condiciones de cámara de crecimiento controlado.

Esta precisión es importante de realizar pues se conoce que los metabolitos al igual que los agroquímicos pueden presentar respuesta diferencial dependiendo de las características del suelo como contenido de materia orgánica, textura, estructura, cultivo sembrado, condición ambiental, entre otros (Sánchez de P., 2007; Márquez, S. 2011).

Como síntesis de esta investigación se puede afirmar que el tomate, objeto de este estudio es altamente susceptible al ataque de *Fusarium* spp y el control

tradicional con agroquímicos se muestra insuficiente para contrarrestar su ataque y torna al cultivo cada vez más costoso, contaminado y contaminante.

El disponer de metodologías estandarizadas y el trabajo previo de diferentes investigadores facilitó el aislamiento y obtención de cultivos puros de *X. bovienii*, *B. subtilis* y *Fusarium* spp, como se ha expuesto en capítulos anteriores.

La cinética de *X. bovienii* en biorreactor mostró que las mayores tasas de crecimiento ocurrieron durante las 8-12 h con desarrollo prolongado hasta las 40 h, aproximadamente. En estos tiempos ocurrió la mayor producción de los metabolitos obtenidos y su actividad inhibitoria sobre *B. subtilis* y los seis aislamientos de *F. oxysporum* (crecimiento vegetativo y reproductivo. Los metabolitos extraídos mediante compuestos orgánicos y butanol presentaron las mayores respuestas inhibitorias sobre *Fusarium* spp. La respuesta de *B. subtilis* corroboró el acierto al utilizar esta bacteria como organismo indicador de antibiosis, dada su susceptibilidad (Isaacson, 2000; Xu, 1998).

Los costos de separación de los metabolitos en términos de equipos, reactivos y tiempo, unidos a los resultados obtenidos, plantean que, es posible, que en esta etapa del conocimiento sea más conveniente utilizar con fines de biocontrol el medio de cultivo donde se incubó *X. bovienii* (con fines biotecnológicos de propiciar la simbiosis con *S. feltiae*) que obtener metabolitos separados. Esto, aparentemente, lo corrobora el hecho de que los mejores resultados en las pruebas de antibiosis se lograron con los metabolitos extraídos con compuestos orgánicos y butanol.

Aunque no se encontró una respuesta fitotóxica de las semillas y plántulas de tomate variedad Santa Cruz a los metabolitos de *X. bovienii* extraídos a partir del medio de cultivo de la bacteria, la implementación de la alternativa biotecnológica constituida por metabolitos secundarios extraídos y ofrecidos individualmente, requiere aún de un proceso investigativo continuado y profundo, que permita dar respuesta a interrogantes a resolver para sustentar los beneficios y necesidad del uso del bioinsumo como metabolito purificado.

## 8. CONCLUSIONES

- Del suelo y rizosfera del cultivo del tomate se aislaron distintos géneros fungosos que hacen parte de grupos funcionales que cumplen diferentes actividades en el suelo. Se lograron trece (13) aislamientos de *Fusarium* spp de los cuales seis (6) presentaron alta incidencia y severidad en pruebas de patogenicidad sobre semillas de tomate.
- El mayor crecimiento de *Xenorhabdus bovienii* en medio NBTA ocurrió en las 8-12 horas de incubación, tiempos coincidentes con la máxima producción de metabolitos secundarios obtenidos por seis metodologías de extracción.
- Los metabolitos de *X. bovienii* obtenidos a través de las seis metodologías probadas, con excepción de la extracción con proteínas, inhibieron el crecimiento de *B. subtilis* y de los aislamientos de *Fusarium* spp, en su fase vegetativa y reproductiva.
- Aunque los resultados variaron entre aislamientos fungosos, las mayores inhibiciones ocurrieron cuando los metabolitos se extrajeron con butanol y con compuestos orgánicos.
- Los metabolitos obtenidos mediante las diferentes metodologías no presentaron efectos fitotóxicos sobre semillas y plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) variedad Santa Clara sembradas en un suelo *TypicHapludands*, en condiciones controladas.
- Los costos económicos de la tecnología de extracción de los metabolitos de *X. bovienii*, aunados a la complejidad de la respuesta inhibitoria en los diferentes aislamientos de *Fusarium* spp hacen recomendable, a corto plazo, la investigación y uso con fines de biocontrol del medio de cultivo donde se incubó la bacteria, con todos sus componentes, dadas las potencialidades que presenta este microorganismo, las cuales se han corroborado en la presente investigación y la urgencia de medidas alternativas de control.

## BIBLIOGRAFIA

- ABELLERIA A., Resumen\_Nematodos entomopatogenos: Estudio de compatibilidad de *paecilomyces lilacinus* con nematodos entomopatogenos (Rhapditida: *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*) Estación Fitopatológica do Areeiro. Deputación de Pontevedra. 2010.
- ARKHURST, R. J. Morphological and Functional Dimorphism in *Xenorhabdus* spp., Bacteria Symbiotically Associated With the Insect Pathogenic Nematodes Neoplectana and Heterorhabditis. En: Journal of General Microbiology 1980. 121, p. 303 – 309.
- AKHURST, R.J.; BOEMARE, N.E., Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. In Gaugler, R. and Kaya, H. (eds) Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1990, p.75-90
- APABLAZA, G. Patología de Cultivos, Epidemiología y Control Holístico. Santiago. Ediciones Universidad Católica de Chile, 1999. p. 347
- APPEL, D. J. y GORDON, T. R. Local and regional variation in populations of *Fusarium oxysporum* from agricultural field soils. Phytopathology, 1994, 84: p.786- 791
- ARBELAÉZ TORRES, Germán. Algunos Aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. Facultad de Agronomía - Universidad Nacional de Colombia Agronomía Colombiana, 2000. 17: p. 11-22
- ARGOTTI V. Eduardo, GALLEGOS Patricio, ALCAZAR Jesús y KAYA Harry; Caracterización ecológica de nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* aislados de *Tecia solanivora*. En: Serie Zoológica 6:173-IS4 Sangolquí –Ecuador, 2010. p. 173-184
- BARNET, H. L.; Hunter, B. B. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Company. Third Edition. U.S.A, 1972. p. 241.
- BIRD, A. F., and AKHURST, R. J. The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. Int. J. Parasitol. 16:511–518. Boemare, N. E., Laumond, C. y Mauleon, H. The entomopathogenic nematode-bacterium complex: Biology, life cycle and vertebrate safety. Biocontr. Sci. Technol 1983, 1996.6: p. 333-346
- BLANCARD, D., A. Colour Atlas of Tomato Diseases. Observation, Identification and Control. Manson Publishing, John Wiley & Sons New York, Toronto, 1997. p. 209
- BOEMARE N. E., GIVAUDAN A., BREHELIN M., and LAUMOOND, C. 1997., Symbiosis, 22, p. 21.

BOEMARE N. E and AKHURST, R. J.; Biochemical and Physiological characterization of Colony form Variants in *Xenorhabdus spp* (enterobacteriaceae), J. Gen. Microbiol 1987. 134: 1835-1845 p.

BOEMARE, N. E. and AKHURST R. J. (1988). "Biochemical and Physiological Characterization of Colony Form Variants in *Xenorhabdus spp.* (Enterobacteriaceae)." Journal of General Microbiology 134: p. 751-761.

BOEMARE, N.; LAUMOND C., and MAULEON H., The entomopathogenic nematode bacterium complex: Biology, life cycle and vertebrate safety. *Biocontrol Sci Technol* 1996. 6(3): p. 333-345. Septiembre -Diciembre 2007.

BOWEN, D., M. Blackburlern, *et al.* (2000). Secreted proteases from *Photorhabdus luminescens*: separation of the extracellular proteases from the insecticidal Tc toxin complexes." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: p. 69-74.

BOYCE J.M., in: Antimicrobial Resistance: A Crisis in Health Care, D. L. Jungkind, J. E. Mortensen, and G. B. Calandra (eds.), Plenum Press, New York 1995. 177p.

BUENO Mirian, FELDMAN Susana y ORTIZ Juan, Desinfección de cariopses y regeneración de plantas de *Spartina argentinensis* Cien. Inv. Agr. 34(3): 231-236. VOL 34 N°3 Septiembre- Diciembre de 2007. 5p.

BURITICÁ C. P. Las enfermedades de las Plantas y su Ciencia en Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias, departamento de Agronomía, Grupo de Sanidad Vegetal Medellín, 1999. p. 4248-4245

BURNELL, M. A.; Stock. P., *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts - lethal pathogens of insects. *Nematology*, 2000, p. 31-42

CABRAL C.N.; CHERQUI A.; PEREIRA A y SIMÕES N.; Purification y Characterization of two distinct metalloproteases secreted by entomopathogenic bacterium *Photorhabdus sp* strain Az29a. *Applied and environmental microbiology* Vol 70, N° 7, 2004, p.3831-3838

CAPRA, F., La trama de la vida. "Una Nueva perspectiva de los Sistemas Vivos" Editorial Anagrama S.A., Barcelona, España., 2003, 179 p.

CAMPOS HERRERA, R., *et al.* Characterization of *Xenorhabdus* isolates from La Rioja (Northern Spain) and virulence with and without their symbiotic entomopathogenic nematodes (Nematoda: Steinernematidae)., *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009. 102, p. 173-181.

CCI Corporación Colombia Internacional., Publicaciones Acerca del Cultivo de Tomate en el Valle del Cauca 2010, p. 337-378

CCI Corporación Colombia Internacional., Publicaciones Cultivo de Tomate Valle del Cauca 2006, p. 437-489

CHAVARRÍA–HERNÁNDEZ N., Efecto del medio de cultivo sobre la cinética de producción de fases infectivas juveniles del nematodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae*, en cultivo monoxénico sumergido., Revista mexicana de ingeniería química., vol.7 no.1 México abr. 2008. p. 13-18

CHEN, G; DUNPHY, G.B. y WEBSTER J.M. Antifungal activity of two *Xenorhabdus* species and *Photorhabdus luminescens* species of *Heterorhabditis megidis* 1994. Biological Control 4: 157-162 p.

CHEHRI, K., Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran. Saudi Journal of Biological Sciences 2011. Vol 18, 341–351 King Saud University.

COLLAR, J.L.; GÁLVEZ y MATING V. Disruption strategies for the control of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella* Saunders) in cotton fields Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas Abr-Jun 2002. p. 193-198.

COMERIO RICARDO, M; PILDAIN M, Belén y ROMERO, Andrea I. Nuevos contaminantes fúngicos de productos alimenticios en Argentina., Rev Iberoam Micol 2005; 22: p. 50-53.

COMPANT, S., et al. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, Mechanisms of action, and future prospects. Appl. Environ. Microbiol. 2005. p. 4951- 4959.

COTES, A M., CARDENAS, A. y PINZON, H. Effect of seed priming in the presence of *Trichoderma koningii* on seed and seedling disease induced in tomato by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. En: Monte, E., Freeman, S. and Elad, Y. (Eds.). Biocontrol agents modes of action and their integration with other means of control. Bulletin IOBC/WPRS. Sevilla, España 2001. Vol. 24 (3): p. 259-263.

CHAVARRÍA HERNÁNDEZ, N., Efecto del medio de cultivo sobre la cinética de producción de fases infectivas juveniles del nematodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae*, en cultivo monoxénico sumergido., Revista mexicana de ingeniería química., vol.7 no.1 México abr. 2008. p. 13-18.

CUERVO LOZADA JEANNY PAOLA, Aislamiento y caracterización de *Bacillus spp* como fijadores Biológicos de Nitrógeno y Solubilizadores de Fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales., Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Microbiólogo Agrícola y Veterinario, Pontificia universidad Javeriana Facultad de ciencias básicas, Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá D.C. 2010.

DALL-BELLO, Gustavo M. Hongos Fitopatogenos en suelos de la región hortícola Platense: Estudios Cualitativos de Patogenicidad, facultad de Agronomía Universidad de la Plata, 1998, 60-199 p

DESJARDINS A.E. and PROCTOR R.H. Molecular biology of Fusarium mycotoxins, International Journal of Food Microbiology 119 . 2007, 47–50p.

DUARTE SILVIA Maritza., Pruebas de patogenicidad de Microorganismos Aislados de Palmas, afectadas por marchitez Letal., Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias, Microbiologia Agricola y Veterinaria, Bogotá D.C. Noviembre de 2007

EHLERS R.U., Mass Production of Entomopathogenic Entomopathogenic Nematodes for Plant Protection. Appl Microbiol Biotechnol 2001.623-633 p.

EHLERS, R.-U., S. LUNAU, *et al.* (1998). "Liquid culture of the entomopathogenic nematode-bacterium- complex *Heterorhabditis megidis/Photorhabdus luminescens*." Biocontrol 43: 77-86.

ENSIGN, J. C. and CICHE, T. 2000 Release of *Photorhabdus luminescens* cells from infective juvenile nematodes of *Heterorhabditis*. Abstracts of 2nd US/Hungarian EPN/EPB Annual Meeting, Hungary.

ENSIGN, J., y NI. C. Crystalline inclusion proteins and an insecticidal toxin of *Xenorhabdus luminescens* strain NC-19. Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, 1990 Adelaide, Australia.

ESCALONA, Yoleidy; RODRIGUEZ, Dorian y CONTRERAS, Nancy. Patógenos del suelo en el cultivo de pimentón en la zona baja del Municipio Jiménez, Estado Lara, Venezuela. Bioagro, 2006, vol.18, no.1, 003-013 p.

FARMER J. J. et al., Clin. Microbiol., 1998., 27, 1594 p.

FODOR Andras. Comparative analysis of antibacterial activities of *Xenorhabdus* species on related and non-related bacteria *in vivo*, Institute of Plant Protection, Georgikon Faculty, University of Pannonia, H-8360 Keszthely, Deák Ferenc utca 17, Hungary, Accepted 25 June, 2010, 36 – 46 p.

PATRIGNANI, ANDRÉS, BUENO MIRIAM, y FELDMAN SUSANA, MICROPROPAGACION DE PLANTAS DE *Spartia argentinensis* a partir de meristemas, revista de investigaciones de la Facultad de ciencias Agrarias Universidad del Rosario, 2008, vol XIII, Argentina.

FORST, S. y TATABAI, N. Role of the histidine kinase, EnvZ, in the reproduction of outer membrane proteins in the symbiotic-pathogenic bacterium. *Xenorhabdus nematophilus*. Applied and Environmental Nematology, 1997. 63: 962- 968 p.

GARCÍA Alexandra, LOTERO Luis Hernando, LEGUÍZAMO María Claudia., SANCHEZ DE PRAGER Marina; PARADA, Julio Cesar, SANCHEZ, Nieves Jimena JIMENEZ, Jades. Hongos en rizosfera de Tomate (*Lycopersicon esculentum*) en Toro Valle del

Cauca. XIV Congreso Colombiano de La Ciencia Del Suelo Villavicencio Meta 29,30 y 31 de Octubre 2008, 4 p.

GARCIA FRUITOS Elena. Los cuerpos de inclusión bacterianos tienen proteínas funcionales, Instituto de Biotecnología y de Biomedicina "Vicent Villar Palasí" (IBB) Universitat Autònoma de Barcelona, 2007 289-294 p.

GARIBALDI, A. Research on substrates suppressive to *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. *Acta Horticulturae*, 1988. 221: 271-277 p.

GAUGLER, R. Biological control potential of neoaplectanid nematodes. *J. Nematol.* 1981. 13(3): 241-249 p.

GAUGLER, R. y GEORGIS. R. Culture method and efficacy of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and heterorhabditidae) 1991. *Biol. Control.* 1: 269-274 p.

GAUTHIER, T., THIBAUT, J. y LEDUY, A. Measuring  $k_La$  with Randomly Pulsed Dynamic Method, *Biotechnology and Bioengineering*, 37: 1991. p. 889-893.

GEORGIS, R. and POINAR, G.O. Jr. Nematodes as bioinsecticides in turf and ornamentals. In: A.R. Leslie and U.S. EPA, eds. *Handbook of integrated pest management for turf and ornamentals*. Boca Raton, FL, CRC Press, 1994. 477-489 p.

Gobernación Valle del Cauca, Informe de Coyuntura por Productos y Grupos de Productos Agrícolas para el Departamento del Valle del Cauca, 2005.

Gobernación del Valle del Cauca, Informe de Coyuntura por Productos y Grupos de Productos Agrícolas para el Departamento del Valle del Cauca, 2008.

GREWAL, P.S., Enhanced Ambient Storage Stability of an Entomopathogenic Nematode Trough Anhydrobiosis. *Pest Management Science*, En: Patogenicidad de Nematodos Entomopatógenos (Nematoda: Steinernematidae, Heterorhabditidae) en Reyes Miguel A., Larvas y Pupas de Mosca de Fruta *Anastrepha ludens* Loew, (Diptera: Tephritidae). Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad de Colima, Tecomán Mexico. 2000, 2003. 56, 401-406 p.

GREGSON R.P., and MCINERNEY B. V., Xenocumacins., United States Patent, 1998, 1188- 1193 p.

HARRIS Brandon. Hambruna holandesa de 1944., Proyecto de hambre Naciones Unidas., actualizado, 29 de nov de 2011., 4p.

HAZIR, S., KAYA, H. K., Stock S. P. and Keskin, N, Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for Biological Control of Soil Pests. *Turk. Journal.* 2003. *Biol.* 27: 181- 202 p.



HU, K; LI, J. y WEBSTER, J., Nematicidal metabolites produced by *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae), bacterial symbiont of entomopathogenic nematodes 1999. *Nematology* 1: p. 457-469

HU, K. y WEBSTER, J.M. In vitro and in vivo characterization of a small colony variant of the primary form of *Photorhabdus luminescens* MD, 1998, 3214-3219 p.

HU, K; LI, J. y WEBSTER, J. M. *Chromatography B.* 1997, 703, 177 p.

ISAACSON Peter. Antimicrobial activity of *Xenorhabdus* sp. (Enterobacteriaceae), symbiont of the entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* (Rhabditida: Steinernematidae) Simon Fraser University, 2000, 34-98 p.

ISAACSON P. J. Antimicrobial activity of *Xenorhabdus* sp. (Enterobacteriaceae), symbiotic of the entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* (Rhabditida: Steinernematidae) B Sc Thesis, University of Victoria, Canada, 1994, 245-252 p.

JACOBSON, D, J. y GORDON, T. R., Vegetative compatibility and self-incompatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Phytopathology*, 1988. 78: 668-672 p.

KAYA, H.K.. in R. Gaugler and H.K. Kaya, eds. *Soils ecology., Entomopathogenic Nematodes in Biological Control.* CRC Press. Boca Raton, FL, 1990. 93-111 p.

KAYA, H. K. y GAUGLER R.,. *Entomopathogenic nematodes.* Annual Review of Entomology, 1993. 38: 181-206 p.

KLOEPPER, J; RYU, C; ZHANG, S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 2004. 94 (11) p.

KRASOMIL-OSTERFELD K. C., *Appl. Environ. Microbial*, 1995, 61, 3748 p.

LARA MANTILLA Productividad y selectividad del medio de cultivo a partir de guayaba agria (*Psidium araca*) en el crecimiento de levaduras nativas del género *Candida* sp., *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. XII, núm. 2, diciembre, 2010. p. 119 -125.

LEGUÍZAMO M.C., PARADA J.C., Resumen, Avances Biotecnológicos en el Complejo *Steinernema feltiae* – *Xenorhabdus bovienii*, para el Control de Plagas y Enfermedades. 1er encuentro Internacional en Biotecnología y 1era Feria de exhibición Biotecnológica, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín Marzo 10 al 14. 2008

LEGUÍZAMO B. M. C., Parada, S. J. C., Y Piedrahita W. Evaluación de *Steinernema feltiae*, cepa Colombia, escalado por fermentación, sobre *Tecia solanivora*, en condiciones de cultivo. En: Parada S. J. C., Luque Z. J. E. y Piedrahita C. W. de J., (Eds) *Nematodos Entomoparásitos Experiencias y Perspectivas*, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 2006, 137 155 p.

LESLIE, John F. y SUMMERELL Brett A. *Fusarium laboratory manual* /, Blackwell Publishing. 2006. p. 97-112

LI Jianxiong, HU Kaiji y WEBSTER J. M. Antibiotics from *Xenorhabdus spp.* AND *Photorhabdus spp.* (ENTEROBACTERIACEAE) (REVIEW) Chemistry of Heterocyclic Compounds, 1998, Vol 34, No. 1. 1331 -1339 p.

LÓPEZ J. C ¿Es posible el uso de entomonematodos en programas MIP en Colombia? Avances con la broca del café. Memorias, XXXII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología, 2005, Socolen. 33 p.

LOZANO María Denis., Manual del manejo preventivo de la Secadera (*Fusarium sp*) en el Cultivo de Maracuyá, Producción sostenible., Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA, C.I. Nataima, (Huila) Primera edición: Octubre de 2008.

MARTÍNEZ POLO, OscarJavier. Determinación de Párametros Básicos de Escalamiento en la producción del Nematodo entomoparásito *Steinernema feltiae* Como Controlador Biológico de Insectos Plaga en Medio líquido. Tesis de Grado M. Sc. En Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Maestría en Ingeniería Química, Bogotá D.C. 2010. 122 p.

MARTÍNEZ POLO, Oscar Javier Comunicación personal, Químico, Estudiante M.Sc. Química, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. 2009.

MARTÍNEZ, O.J; VANEGAS, J; SANCHEZ, J.; PARADA J.C. Selección de Medios de Cultivo Para *Xenorhabdus bovienii*, simbiote de *Steinernema feltiae* en: Parada J.C., Luque J., Piedrahita W., Nematodos Entomoparásitos, Experiencias y Perspectivas. Universidad Nacional de Colombia, Bogota, 2006, p. 100 -113

MAXWELL PHILIPH, Y CHEN GENCHUI, JOHN M WEBSTER Y GARY B. DUNPHY. Stability and activities of Antibiotics Produced during Infection of the Insects *Galleria mellonella* by Two Isolates of *Xenorhabdus nematophilus*. Applied and Enviromental Microbiology, AmericanSocietyfor Microbiology, 1994. p. 2049-2052.

MCINERNEY, B., Biologically active metabolites from *Xenorhabdus spp.* Part 1. Dithiolopyrrolone derivatives with antibiotic activity 1991. Journal of Natrla Products 54: 774- 784 p.

MELO, Elsa Liliana. Comunicación personal, Bióloga. CIAT. 2007.

MELO E., y GAIGL A., Experiencias con el uso de nematodos entomoparásitos, en el manejo de dos plagas subterranas del tropico central de Colombia, Memorias XXXI Congreso Colombiano de Entomología SOCOLEN, 2004., p.203-206

MELO, E; ORTEGA, C; GAIGL, A. y BELLOTI, A. Efecto del estado de desarrollo de *Phyllophaga menetriesi* y *Anomala inconstans* (Coleoptera: Melolonthidae) con dos aislados de entomonematodos En: Resúmenes del XXXII Congreso Sociedad Colombiana De Entomología SOCOLEN. 2005. 80 p.

MOLINA Juan Pablo, Mecanismos fisiológicos de inmunidad en Insectos. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Riveiro., Campos dos Goytacazes. Rio de Janeiro, Brasil. . 2007.1-3 p.

NG, K.K. and WEBSTER. J.M. Antimycotic activity of *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae) metabolites against *Phytophthora infestans* on potato plants. Canadian Journal of Plant Pathology, 1997. 19: p.125-132

OYERVIDES, C.M.S., Producción y Exportación de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en el Período de 1995 1998. M. L. Buenavista, Saltillo Coahuila México, 1999. 90 - 109,111 p.

PARADA S. J. C, "*Steinernematidae* y *Heterorhabditidae* en áreas de producción papera en Cundinamarca y sur de Boyaca", tesis M.Sc, Universidad nacional de Colombia, área Entomología, 1998. 103 pp.

PARADA, S. J. C; VANEGAS, G. J., MARTÍNEZ, P. O. J, SÁNCHEZ, J., y PIEDRAHITA, W. Determinación Por Colorimetria De Variación De Fase En Cultivo Líquido De *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae), Resúmenes XXXII, Congreso Sociedad Colombiana de Entomología SOCOLEN, 2005. 79 p.

PARADA, J.C; LUQUE, Z.J.E., PIEDRAHITA, C., W de J, Nematodos entomoparásitos, Experiencias y Perspectivas Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá. 2006. 197 p.

PARDO CARDONA, V.M. Hongos fitopatógenos de Colombia. Centro publicaciones. Universidad Nacional. Medellín,1995. 166 p.

PARK, Youngjin y KIM Yonggyun,. Inhibitory Effect of an Entomopathogenic Bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, on the Release of Arachidonic Acid from the Membrane Preparation of *Spodoptera exigua*. Physiology and Biochemistry., J. Asia –Pacific Entomol, 2005. 8(1): p. 61-67.

PATÍÑO LADINO, Antibacterial properties *in vitro* of secondary metabolites isolated from two species of *Zanthoxylum* (Rutaceae) genus, Revista Cubana de Farmacia versión ISSN 0034-7515 vol.45 no.3 Ciudad de la Habana jul.-set. 2011, 45 (3):431-438.

PAUL V.J; FRAUTSCHY, S; FENICAL, W. Y NEALSON, K.H. Antibiotics in microbial ecology, isolation and structure assignment of several new antibacterial compounds from the insect symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp, 1988,. Journal of chemical Ecology 7: p.589-597.

PERA, J. y CALVET, C, Suppression of Fusarium wilt of carnation in a composted pine bark and a composted olive pumice, 1989. Plant Disease 73: p. 699-700.

PEREYRA, Silvia y DILL-MACKY, Rut. Fusarium Species Recovered from Wheat and Barley Grains in Uruguay, Pathogenicity and Deoxynivalenol Content. Agrociencia Uruguay 2010, vol .14, n.2, p. 33-44.

PINYON, Rebecca A. HING, Fan y CONNOR, J. Thomas. *Xenorhabdus bovienii* T228 phase variation and virulence are independent of RecA function., Genetics and Molecular Biology., Microbiology, 2010. 146- p. 2815-2824

POINAR, G.O.Jr. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. R. Gaugler y H.K. Kaya, Eds. CRC Press. Boca Raton, Fla 1990. 23-61 p.

REYES HERNANDEZ Miguel Angel., Larvas y Pupas de Mosca de Fruta *Anastrepha ludens* Loew, (Diptera: Tephritidae). Tesis de Maestria en Biotecnología. Universidad de Colima, Tecomán Mexico, 2003. 133-143 p.

RODRIGUEZ PEREZ Fructuoso, *Heterorhabditids Bacteriophora* HC1, estrategia de desarrollo como Agente de control Biológico de Plagas Insectiles. Tesis de grado Doctor en Ciencias Agrícolas., Universidad Agraria de La Habana Cuba., Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, 2007.113-118 p.

RODRIGUEZ L. V., Efecto Antagonico y biocontrolador de Algunos Microorganismos Saprofiticos contra un fitopatógeno causante del Damping Off en plantas de tomate, 2002 26-27 p.

SÁENZ, A. Velocidad de desplazamiento en palmas de vivero de larvas de primer instar de *Zagalaza valida* (Lepidoptera: Glyphipterigidae) En: Resúmenes del XXXII Congreso Sociedad Colombiana De Entomología SOCOLEN, 2005. 11p.

SAGARRA, L. A.; PETERKIN, D. D.; VINCENT, C.; STEWART R. K. Immune response of the hibiscus mealybug, *Maconellicoccus hirsutus* Green (Homoptera: Pseudococcidae), to oviposition of the parasitoid *Anagyrus Kamali* Moursi (Hymenoptera: Encyrtidae). Journal of Invertebrate Physiology, 2000. 46, 647-663 p.

SALAS-LUEVANO, Miguel Angel , REBOLLEDO OSCAR, D., y MOLINA, Jaime., Existencia de Nematodos Entomopatógenos (Steinernematidae y Heterorhabditidae) en Agroecosistemas del Cañon de Juchipila, Zacatecas Mexico., 5as Jornadas de Investigación, Universidad Autónoma de Zacatecas. Mexico, 2001. p. 4-18

SÁNCHEZ N. J. Control biológico de hongos fitopatógenos causantes de pudrición basal en plantas de *Gypsophila paniculata* y *Limonium sinuatum*, mediante aplicación de *Trichoderma* sp. Tesis Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, 2005. 23-35 p.

SANCHEZ DE P. M. Las Endomicorizas Expresión Bioedáfica de Importancia en el Trópico. Universidad Nacional de Colombia, -Sede Palmira. 2007. p. 63-72

SANCHEZ DE P. M., PARADA J.C y JIMÉNEZ, J. “Escalado y Formulación Industrial de *Steinernema feltiae* (Cephalobina: Steinernematidae) Cepa Colombiana y su bacteria Simbionte *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae) para el control de insectos y fitopatógenos” Informe Final a Colciencias., 2010,

SOSA, Acenet et al. Identificación y caracterización de seis aislados pertenecientes al género *Bacillus* promisorios para el control de *Rhizoctonia solani* Kunhy *Sclerotium rolfsii* fitosanidad vol. 15, no. 1, marzo 2011, pp. 39-43, UN Argentina.

SUTTON, B., A century of mycology. Ed. Cambridge University Press. USA, 1996, 641-655 p.

TENORIO REYNALDO, Concentraciones de Saponina de *Chenopodium quinoa* y de *Caiphora andina*. Alternativas como biocontroladores de hongos Antagonistas., Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas e Instituto de Investigaciones en Productos Naturales, Universidad Mayor de San Andres – UMSA., Revista Boliviana de Bioquímica Vol (27)No 1- 2010. p. 33-40

THALER, J.; Duvigivaudan, A. y BOEMARE, N. Isolation and entomotoxic properties of the *Xenorhabdus nematophilus* FI lecithinase Applied and Environmental Microbiology 64: 1998. p. 2367 – 2373.

TORRENEGRA R. D. y BAQUERO J.E. Determinación de Metabolitos Secundarios a partir de una Cepa Nativa de *Penicillium* sp. Aislada del Paramo de Guasca, Departamento de Cundinamarca., Grupo de Investigación en Biotransformación ( GIBUJ ) Departamento de Química, Pontificia Universidad Javeriana, 2005, 67-85 p.

TORRES ALÍ, REYES VIDAL Asaff, LÓPEZ Yolanda; DE LA TORRE Eric y GUERRA MAYRA., entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de Plagas., XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería, Cinevetav, Mexico. 2002, 356-362 p.

TRIVIÑO, J.C.; PARADA J.C. y LUQUE J.E. y Biología Básica de *Steinernema feltiae* En: Parada S. J. C., Luque Z. J. E. y Piedrahita C. W. de J., (Eds) Nematodos Entomoparásitos .Experiencias y Perspectivas, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2006. 42-59 p.

TROYA, M. T. DE; NAVARRETE A., DE LA VEGA R. y GARCÍA DE LOS RÍOS J. E.. Influencia de los medios de cultivo sobre la virulencia de las cepas de hongos xilófagos. Bol. San. Veg. Plagas, 21: 439-444, 1995

URIBE D. Control Biológico de Insectos Plaga: Mito académico o realidad Agrícola, en Sánchez N, J., 2007 Potencial Biotecnológico de Microorganismos en Ecosistemas Naturales y Agroecosistemas; colección de Monografías, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá, 2007. 88- 93 p.

USDA, Keys to Soil Taxonomy, 2010.

VELA APARICIO, Diana. Protocolo de Obtención y Purificación de Proteínas con Posible actividad Biológica de *Xenorhabdus bovienii*, Informe: "Escalado y Formulación industrial de *Steinernema feltiae* (Cephalobina Steinernematidae) cepa Colombia y su bacteria simbiote *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae) para el control de insectos y

fitopatógenos". Estudiante de Química Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá., 2008.

VELA APARICIO, Diana. Informe Final Metodologías de Obtención de Metabolitos Secundarios con Capacidad Antibiótica, dentro del proyecto "Escalado y Formulación industrial de *Steinernema feltiae* (Cephalobina Steinemtematidae) cepa Colombia y su bacteria simbiote *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae) para el control de insectos y fitopatógenos", Estudiante de Química Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá., 2009.

VELA D.G., LEGUÍZAMO M.C., PARADA J.C., SÁNCHEZ DE P. M. Extracción de Metabolitos Secundarios con Actividad Antibiótica de *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae) XLIV Congreso Colombiano de Ciencias Biológicas, Popayán, Octubre 6 al 10. 2009a

VERGARA Maciel, Cultivo Monoxénico Sumergido del Nematodo Entomopatógeno, *Steinernema carpocapsae* CABA01, en Biorreactor *airlift* con Recirculación Interna, Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria. Centro de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de los Alimentos del Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 2010. 1-14 p.

VERGARA RUIZ Rodrigo. Enfoque Agrologico del Empleo de Entomopatógenos para el Control de Plagas., Profesor: Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias., Octavo Seminario de Agroecología Agromedicina y Medio Ambiente. Tunja 22 y 23 de Noviembre, 2004.

VOLGY, A., et al. Phase Variation in *Xenorhabdus nematophilus*., American Society Microbiology, 1998. p. 132-139.

WANG Y-H., Enhanced antibiotic activity of *Xenorhabdus nematophila* by medium optimization. 2011. Bioresources Technology Vol 99,1708-1715 p.

WABG YONGHONG, Improvement of antibiotic activity of *Xenorhabdus bovienii* by medium optimization using response surface methodology. Center of Biorational Pesticides, Northwest A & F University, Xinong Road 22, Yangling, Shaanxi 712100, P. R., China 2011, 15 p.

WEE, K., Y. Ren, et al. (2000). "Deficiency of Current Methods in Assaying Endochitinase Activity." Biochemical and Biophysical Research Communications 268(2): 302-305.

WEBSTER, J. M., CHEN, G. y LI, J. Parasitic worms: an ally in the war against the superbug. Parasitology Today, 1998.14: p. 161- 163.

WEBSTER, J.M.; LI J. y CHEN G. Xenomins Novel Heterocyclic Compounds with Antimicrobial and Antineoplastic Properties. 1998. p.133-139

XU, Ch. The Stability and Cytotoxic Properties of Xenorhabdies and Xenorhabdins, Secondary Metabolites of the Entomopathogenic Nematode Symbiont, *Xenorhabdus bovienii* (enterobacteriaceae). Simon Fraser University, 1998 . p. 268-278

WEBSTER, J.M., LI J. y CHEN G. Xenomins Novel Heterocyclic Compounds with Antimicrobial and Antineoplastic Properties World intellectual property organization Bureau, International Patent Classification: A61 K 37/00, 514/12 International Publication number 5 International Publication Date: 29/10/1998., 569, 668 p.

YANG Xiu-fen et al. Inhibition of metabolites from *Xenorhabdus nematophilus* against *Phytophthora infestans* Journal of Agricultural University of Hebei, 2001. p. 149-167

ZAHNER H. y FIEDLER H. P., in: Fifty Years of Antimicrobials: Past Perspectives and Future Trends, P. A. Hunter, and G. K. Darby, N. J. Russell (eds.), Cambridge University Press, Cambridge, 1995. p. 67-84.

## REFERENCIAS DE INTERNET

Agencia de Noticias UN., Universidad nacional de Colombia, Investigan Resistencia contra Parásito Oomiceto en Cultivos Bogotá D.C. Octubre 21 de 2011. [Revisado: Diciembre 26 de 2011].

BIZKAIA, Anibal. Quorum sensing. University of Deusto 2003., [sapereaudere.blogspot.com /2009/04/quorums-sensing.html](http://sapereaudere.blogspot.com/2009/04/quorums-sensing.html) [Revisado, Diciembre 28 de 2011]

Boletín Informativo de la Sociedad Española de Fitopatología, Boletín Numero 75 septiembre de 2011, 49 p.

Botanical Online 2011, [botanical-online.com/botanica2.htm](http://botanical-online.com/botanica2.htm)

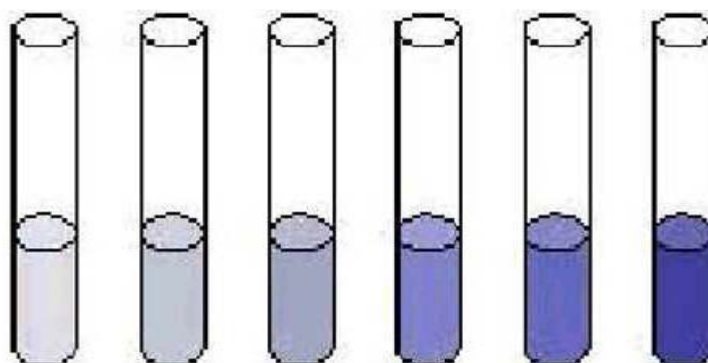
FLOREZ, Gisselle y RAMIREZ , Berenice, 2010, Mesa 3 Bacteriología. [Revisado: 15 de agosto 2011].

Homo Agrícola, [www.virtual.unal.edu.co/revistas/actabiol/Resumenes/.../R1V6N1.pdf](http://www.virtual.unal.edu.co/revistas/actabiol/Resumenes/.../R1V6N1.pdf), [Revisado: 15 agosto de 2011]

InfoAgro Podredumbre apical en tomates, Infoagro. El cultivo del tomate. Disponible en: <http://www.infoagro.com/hortalizas/tomate.htm>, 2005. [Revisado: 13 septiembre de 2011][www.infoagro.com/hortalizas/tomate.htm](http://www.infoagro.com/hortalizas/tomate.htm) [Revisado: 20 de septiembre 2011].

## ANEXOS

### ANEXO A. Series de Dilución de hongos extraídos de campo.



Tomado de: Laboratorio de Diagnóstico Clínico SJC Clases impartidas en el Centro de Formación San José de Calasanz Ikastetxea (Santurtzi) 2010



**ANEXO B.** Análisis de varianza de la variable halo de inhibición (mm) de seis aislamientos de *Fusarium spp* como respuesta a metabolitos secundarios de *X. bovienii* obtenidos por diferentes métodos de extracción, tiempos y concentraciones.

F.V.	Gli	BTU2		GUM1R2		GUM5R2	
		CM	Pr > F	CM	Pr > F	CM	Pr > F
Método de Extracción	4	0.821	<.0001	0.674	<.0001	0.760	<.0001
Concentración	3	0.188	<.0001	0.138	<.0001	0.011	0.2420
Concentración x Método	12	0.058	<.0001	0.070	<.0001	0.007	0.4890
Tiempo	17	0.165	<.0001	0.053	<.0001	0.158	<.0001
Tiempo x Método	68	0.076	<.0001	0.056	<.0001	0.044	<.0001
Tiempo x Concentración	51	0.047	<.0001	0.043	<.0001	0.006	0.9129
Tiempo x Concentración x Método	204	0.036	<.0001	0.027	<.0001	0.005	1.0000
Promedio		0.626		0.634		0.812	
CV (%)		11.3		10.1		7.7	

F.V.	Gli	GUM6R1		SETM1M4		SETMF1M6	
		CM	Pr > F	CM	Pr > F	CM	Pr > F
Método de Extracción	4	1.049	<.0001	3.949	<.0001	1.042	<.0001
Concentración	3	0.027	0.0459	0.397	<.0001	0.027	0.0821
Concentración x Método	12	0.132	<.0001	0.044	0.0002	0.041	0.0001
Tiempo	17	0.105	<.0001	0.330	<.0001	0.078	<.0001
Tiempo x Método	68	0.032	<.0001	0.079	<.0001	0.030	<.0001
Tiempo x Concentración	51	0.048	<.0001	0.023	0.0045	0.033	<.0001
Tiempo x Concentración x Método	204	0.032	<.0001	0.032	<.0001	0.023	<.0001
Promedio		0.651		0.676		0.622	
CV (%)		9.3		11.0		10.5	

**ANEXO C.** Promedios de halos de inhibición (mm) de los 6 aislamientos de *Fusarium spp* enfrentados a los metabolitos extraídos en diferentes tiempos de incubación de *X. bovienii*

BTU2			GUM1R2			GUM5R2		
Tiempo (horas)	Promedio	Grupo de Duncan	Tiempo (horas)	Promedio	Grupo de Duncan	Tiempo (horas)	Promedio	Grupo de Duncan
40	0,806	a	16	0,727	a	40	0,924	a
16	0,748	ab	12	0,716	a	24	0,902	ab
8	0,725	abc	24	0,695	ab	48	0,899	ab
20	0,717	abcd	48	0,694	ab	20	0,891	abc
12	0,716	abcd	20	0,670	abc	12	0,891	abc
24	0,711	abcd	80	0,668	abc	28	0,891	abc
4	0,693	bcde	28	0,667	abc	56	0,883	abcd
56	0,675	bcdef	56	0,657	abcd	32	0,880	abcd
48	0,659	bcdef	4	0,656	abcd	16	0,866	abcde
28	0,623	cdef	32	0,653	abcde	36	0,824	bcde
64	0,610	defg	8	0,641	abcde	8	0,813	cdef
36	0,602	efg	40	0,616	bcdef	72	0,810	cdef
32	0,591	efg	72	0,600	bcdef	44	0,803	def
44	0,573	fgh	64	0,590	cdefg	4	0,795	ef
88	0,512	ghi	36	0,568	defg	80	0,740	f
72	0,488	hi	44	0,561	efg	64	0,736	f
96	0,460	ij	88	0,538	fg	88	0,623	g
80	0,398	j	96	0,504	g	96	0,481	h

Nota: Dentro de una misma columna, promedios con igual letra no difieren estadísticamente al nivel de probabilidad del 5%.

GUM6R1			SETM1M4			SETMF1M6		
Tiempo (horas)	Promedio	Grupo de Duncan	Tiempo (horas)	Promedio	Grupo de Duncan	Tiempo (horas)	Promedio	Grupo de Duncan
4	0,782	a	16	0,878	a	4	0,727	a
8	0,769	a	12	0,819	ab	48	0,710	ab
12	0,735	ab	32	0,819	ab	24	0,701	ab
32	0,726	ab	4	0,790	abc	12	0,694	ab
72	0,714	abc	8	0,768	bcd	16	0,684	abc
16	0,705	abcd	24	0,754	bcd	40	0,664	abcd
56	0,704	abcd	40	0,747	bcde	44	0,658	abcde
24	0,700	abcd	28	0,744	bcde	32	0,644	abcde
28	0,697	abcd	36	0,711	cdef	20	0,632	abcde
36	0,670	bcde	20	0,704	cdef	28	0,623	bcde
40	0,632	cde	48	0,694	cdef	8	0,621	bcde
20	0,000	de	44	0,684	defg	72	0,616	bcde
48	0,599	ef	56	0,649	efg	64	0,611	bcde
64	0,588	efg	64	0,634	fg	36	0,588	cde
44	0,585	efg	72	0,599	g	80	0,565	de
80	0,522	fgh	80	0,490	h	56	0,559	e
96	0,510	gh	96	0,395	i	96	0,465	f
88	0,486	h	88	0,361	i	88	0,460	f

Nota: Dentro de una misma columna, promedios con igual letra no difieren estadísticamente al nivel de probabilidad del 5%.